

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE BORRAS DO REFINO DE**  
**ÓLEOS VEGETAIS PARA PRODUÇÃO DE LIPASE FÚNGICA POR**  
**FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**

**Regiane Ribeiro dos Santos**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE BORRAS DO REFINO DE  
ÓLEOS VEGETAIS PARA PRODUÇÃO DE LIPASE FÚNGICA POR  
FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**

**REGIANE RIBEIRO DOS SANTOS**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Lucielen Oliveira dos Santos**

*e Co-orientação da Professora*  
**Mônica Caraméz Triches Damaso**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção de Grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós - Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2012

665.3

S237c

T

Santos, Regiane Ribeiro dos, 1986-

Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido / Regiane Ribeiro dos Santos - 2012. 96 f.: il.

Orientador: Lucielen Oliveira dos Santos. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 63-74.

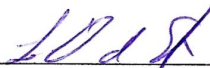
1. Óleos vegetais - Aplicações industriais - Teses. 2. Óleos vegetais - Análise - Teses. 3. *Aspergillus niger* - Teses. 4. Enzimas - Teses. 5. Fermentação - Teses. I. Santos, Lucielen Oliveira dos, 1977-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**REGIANE RIBEIRO DOS SANTOS**

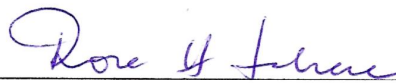
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2012



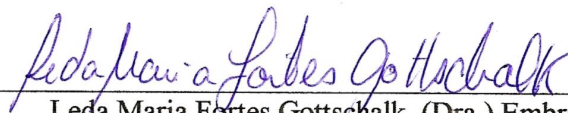
---

Lucielen Oliveira dos Santos. (Dra.) UFRRJ  
(Orientadora)



---

Rosa Helena Luchese. (Dra.) UFRRJ  
(Membro Titular)



---

Leda Maria Fortes Gottschalk. (Dra.) Embrapa  
(Membro Titular)

## DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais, João e Regina, pelo  
carinho, amor e paciência.*

## AGRADECIMENTOS

*À Deus, que me ama incondicionalmente, e me permitiu conhecer pessoas tão maravilhosas que me ajudaram a concluir mais uma etapa .*

*Aos meus familiares pelo carinho e por compreender as ausências.*

*À professora Dra. Lucielen dos Santos e à pesquisadora Dra. Mônica Damaso pela orientação, confiança, paciência e pelos ensinamentos.*

*Aos colegas de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos - PPGCTA, em especial: Ingrid da Mata e Felipe Trombete pelos meses de convivência e troca de experiência.*

*Às estagiárias do Laboratório de Processos Fermentativos da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Aline Cascaes, Gabriela Frutuoso, Gabriela Moisés, Grazielle de Sousa, Livia Nolasco, Ludmila Araújo e Maira Oliveira, pela amizade conquistada ao longo dos meses e pela prazerosa convivência, mas, sobretudo, pelo auxílio na realização dos experimentos.*

*Às técnicas do Laboratório de Processos Fermentativos da Embrapa Agroindústria de Alimentos Selma Terzi, pelo apoio técnico, e minha amiga Érika Fraga pelos bons momentos compartilhados.*

*Às pesquisadoras do Laboratório de Processos Fermentativos da Embrapa Agroindústria de Alimentos Dra. Janine Passos e Dra Leda Gottschalk.*

*À pesquisadora Dra. Rosemar Antoniassi e à amiga, técnica, Gabriela Back ambas do Laboratório de Óleos Graxos da Embrapa Agroindústria de Alimentos pela inestimável colaboração na realização das análises.*

*Aos funcionários do Laboratório de análises Físico-químicas da Embrapa Agroindústria de Alimentos pela ajuda prestada nas análises.*

*Aos funcionários e estagiários da planta 1 e 2 da Embrapa Agroindústria de Alimentos, meus sinceros agradecimentos pela colaboração e gentileza de emprestar os equipamentos.*

*Aos professores pela dedicação, colaboração e pelos ensinamentos úteis para conclusão da dissertação.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro, à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade e à Embrapa Agroindústria de Alimentos por disponibilizar a infraestrutura.*

*Às Indústrias Bunge Alimentos S/A e Granfino S/A pela gentileza de ceder amostras necessárias e indispensáveis à realização desse projeto.*

*A todos, muito obrigada!*

## RESUMO

SANTOS, Regiane Ribeiro. **Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido: UFRRJ, RJ.** 2012. 74p Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação éster do triacilglicerol em uma interface óleo-água, enquanto em ambientes com pouca quantidade de água catalisam reações reversas (esterificação, transesterificação e interesterificação), podendo ser produzidas por fermentação no estado sólido (FES), processo que possibilita agregar valor a resíduos agroindustriais, como as borras de refino de óleo. A produção através de FES tem provado ser uma maneira eficiente de produzir enzimas, por fungos filamentosos, uma vez que fornece aos micro-organismos condições ambientais semelhantes ao seu *habitat* natural. O objetivo deste trabalho foi caracterizar e aplicar as borras de canola, milho e girassol como indutores na produção de lipase fúngica através da FES. As borras, foram caracterizadas quanto ao conteúdo de minerais, cinzas, umidade, óleo neutro, teor de sabão, pH e perfil em ácidos graxos e posteriormente foram testadas para a produção da enzima. A lipase foi produzida em colunas aeradas em banho com circulação de ar a 32°C por 72 h utilizando como suporte/matéria-prima o coproduto agroindustrial farelo de trigo. O micro-organismo utilizado foi o mutante *Aspergillus niger* 11T53A14. Para selecionar o melhor indutor e identificar as variáveis que influenciam no processo, foi aplicado o delineamento fatorial fracionado (DFF) 2<sup>4-1</sup>, sendo as variáveis estudadas: concentração de nitrogênio, volume de solução de sulfato de amônio (VSSA), concentração de inóculo e concentração do indutor. Com as mesmas variáveis (exceto pela concentração de indutor), foi realizado um delineamento fatorial completo (DFC) 2<sup>3</sup> a fim de verificar a produção da enzima sem a presença do indutor. Baseado nos resultados obtidos nos experimentos utilizados, DFF e DFC, foi realizado um delineamento central composto rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup>, com as variáveis estatisticamente significativas. Os extratos enzimáticos produzidos foram analisados em termos de atividade lipásica, atividade proteásica e proteína extracelular total. Os resultados revelaram que as borras apresentaram alto teor de íons sódio, grande quantidade de ácidos graxos linoléico, oléico, esteárico e palmítico, pH básico próximo a 8 e de 30-50% de umidade, 30-45% de sabão e 15-25% de óleo neutro. Dentre as borras testadas, a borra de girassol se destacou na maioria dos ensaios do DFF, proporcionando o maior valor de atividade lipásica (201,81 U/g<sub>ms</sub>) no ensaio 8 (0,5% de nitrogênio presente em 80 mL de solução de sulfato de amônio, 10<sup>8</sup> esporos/g<sub>m</sub> e 3,0% de borra de girassol). Esse resultado foi comparado, através do Teste de Tukey, com a atividade da lipase (182,35 U/g<sub>ms</sub>) produzida sem a presença de indutor, no DFC, revelando que houve diferença significativa (p< 0,05) entre as amostras. As variáveis: VSSA, concentração de nitrogênio e de inóculo influenciaram significativamente (p< 0,1) na atividade e, portanto, foram utilizadas no DCCR. No entanto, a tentativa de otimização através desse planejamento não foi alcançada com os valores selecionados. Contudo, as borras se mostraram promissoras como indutoras para produção de lipase, tendo a borra de girassol se destacado como melhor indutor, justificado pelos resultados encontrados nas análises físico-químicas de caracterização. A produção de lipase com resultados satisfatórios também foi possível independente da adição do indutor lipídico, mas o uso deste elevou a atividade enzimática.

**Palavras-chave:** *Aspergillus niger*, enzima, planejamento experimental, colunas aeradas

## ABSTRACT

SANTOS, Regiane Ribeiro. **Characterization and application of soapstock from the refining of vegetable oils for fungal lipase production by solid-state fermentation:** UFRRJ, RJ. 2012. 74p Dissertation (Master of Science and Food Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Lipases are enzymes that catalyze the hydrolysis of the ester linkage in a triacylglycerol oil-water interface, while in environments non- aqueous, in organic solvents, catalyze reverse reactions (esterification, transesterification and interesterification), can be produced by solid state fermentation (SSF), process that possible to add value to agro-industrial residues such as soapstock to oil refining. The production by SSF has proven to be an efficient way to produce enzymes, especially filamentous fungi, since it provides the microorganism environmental conditions similar to their natural habitat. The objective of this study was to characterize and apply the soapstock of canola, corn and sunflower to induce the production of fungal lipase by SSF. The soapstock were analyzed for mineral content, ash, moisture, neutral oil, soap content, pH and fatty acid profile and subsequently tested for the production of the enzyme. The lipase was produced in columns aerated in bath with air circulation at 32°C for 72 h using as support/feedstock co-product of agro-industrial wheat bran. The microorganism used was the mutant *Aspergillus niger* 11T53A14. To select the best inductor and identify the variables that influence the process was applied the fractional factorial design  $2^{4-1}$ , the variables being studied: nitrogen concentration, volume of solution of ammonium sulfate (VSAS), the concentration of inoculum and concentration of the inducer. With the same variables, except the concentration of the inducer, was applied a full factorial design  $2^3$  to verify the production of the enzyme without the presence of inducer. Based on the results obtained in the designs using, was made a central composite rotatable design (CCRD)  $2^2$  with the statistically significant variables. The enzymatic extracts obtained were analyzed in terms of lipase activity, protease activity and extracellular protein. The results showed that the soapstock had a high content of sodium ions, a large amount of fatty acids linoleic, oleic, stearic and palmitic acid, alkaline pH about 8 and its components are in the range of 30-50% moisture, 30-45% of soap and 15-25% of neutral oil. Among the soapstock tested, sunflower soapstock stood out in most trials of the fractional factorial design, reaching the highest value of lipase activity (201.81 U/g<sub>ds</sub>) in test 8 (0.5% nitrogen in 80 mL of ammonium sulfate,  $10^8$  spores/g<sub>medium</sub>, and 3.0 % sunflower soapstock). This result was compared, by Tukey Test, with lipase activity (182.35 U/g<sub>ds</sub>) produced in the absence of inducer, presenting a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the samples. The variables fractional factorial design: VSAS, nitrogen and inoculums concentration, had significant influence ( $p < 0.1$ ) on enzyme activity and, therefore, were selected for the CCRD. However, the attempt at optimization was not achieved with the selected values. Nevertheless, the soapstocks shown promise as inducers for lipase production when compared with previous studies and the sunflower soapstock was the best inducer, which can be justified by the results of physico-chemical characterization. The production of lipase with satisfactory results it was also possible in the absence of lipid inducer, but use of this increased enzyme activity.

**Key Words:** *Aspergillus niger*, enzyme, experimental design, aerated columns



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação das enzimas baseado no tipo de reação que catalisam. ....	5
Tabela 2 Lipases comerciais produzidas por diferentes micro-organismos.....	8
Tabela 3 Aplicação industrial das lipases. ....	12
Tabela 4 Composição dos resíduos agrícolas.....	22
Tabela 5 Características bioquímicas de lipases microbianas.....	24
Tabela 6 Composição do meio de manutenção e ativação do micro-organismo.....	30
Tabela 7 Valores reais utilizados no delineamento experimental. ....	32
Tabela 8 Matriz do delineamento fatorial fracionado (DFF) $2^{4-1}$ com valores codificados....	32
Tabela 9 Valores reais utilizados no delineamento fatorial completo sem indutor.....	33
Tabela 10 Matriz do delineamento fatorial completo (DFC) $2^3$ , sem pontos axiais e sem indutor, com valores codificados.....	33
Tabela 11 Valores reais utilizados no delineamento experimental com a borra de girassol....	34
Tabela 12 Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) $2^2$ , para a borra de girassol com valores codificados. ....	34
Tabela 13 Resultados das análises físico-químicas realizadas nas borras .....	37
Tabela 14 Atividades lipásicas obtidas em FES utilizando como indutores as borras de canola, milho e girassol.....	41
Tabela 15 Atividades específicas aparentes obtidas em FES utilizando como indutores as borras de canola, milho e girassol.....	41
Tabela 16. Atividade lipásica (U/mL) utilizando como indutor a borra de girassol .....	43
Tabela 17 Atividade proteásica presente no extrato enzimático obtido na FES, para cada borra testada.....	45
Tabela 18 Estimativa dos efeitos para a atividade lipásica usando a borra de canola. ....	46
Tabela 19 Estimativa dos efeitos para a atividade específica aparente da enzima lipase usando a borra de canola. ....	46
Tabela 20 Estimativa dos efeitos para a atividade lipásica usando a borra de milho. ....	46
Tabela 21 Estimativa dos efeitos para a atividade específica aparente da enzima lipase usando a borra de milho. ....	47
Tabela 22 Estimativa dos efeitos para a atividade lipásica usando a borra de girassol. ....	47
Tabela 23 Estimativa dos efeitos para a atividade específica aparente da enzima lipase usando a borra de girassol. ....	47

Tabela 24 Resultado do Teste de Tukey para comparação das médias entre os maiores valores de atividade lipásica do experimento sem e com borra de girassol.....	50
Tabela 25 Estimativa dos efeitos para a atividade lipásica no experimento conduzido sem o uso de indutor. ....	50
Tabela 26 Estimativa dos efeitos para a atividade específica aparente no experimento conduzido sem o uso de indutor. ....	51
Tabela 27 Coeficiente de regressão para atividade lipásica no experimento conduzido sem o uso do indutor. ....	51
Tabela 28 Análise de variância da atividade lipolítica para o experimento sem a presença de indutor. ....	51
Tabela 29 Atividade lipásica e específica aparente presente no extrato enzimático para borra de girassol referente ao primeiro DCCR.....	54
Tabela 30 Teste de Tukey para comparação das médias de atividade lipásica do DFF e do primeiro DCCR.....	54
Tabela 31 Coeficiente de regressão do primeiro DCCR para atividade lipásica.....	54
Tabela 32 Coeficiente de regressão do primeiro DCCR para atividade específica aparente...	55
Tabela 33 Atividade lipásica e específica aparente presente no extrato enzimático com a borra de girassol como indutor e referente ao segundo DCCR. ....	56
Tabela 34 Coeficiente de regressão e desvio padrão do segundo DCCR, para atividade lipásica.....	56
Tabela 35 Coeficiente de regressão e desvio padrão do segundo DCCR, para atividade específica aparente.....	57
Tabela 36 Análise de variância da atividade lipásica. ....	57
Tabela 37 Análise de variância da atividade específica aparente.....	57

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Reação de hidrólise de triacilglicerol catalisada por lipases. ....	9
Figura 2 Reações reversíveis catalisadas pela lipase. ....	10
Figura 3 Morfologia de fungos filamentosos em fermentação em estado sólido. Micélios de fungos com esporos cultivados em substrato sólido. ....	15
Figura 4 <i>A. niger</i> , microscopia eletrônica do aparato reprodutivo assexuado. ....	17
Figura 5 Reator de colunas de vidro para a fermentação em estado sólido. ....	20
Figura 6 Fluxograma para obtenção da borra de óleo. ....	23
Figura 7 Resultado das análises de minerais presentes nas borras. ....	38
Figura 8 Perfil em ácidos graxos dos óleos presentes nas borras. ....	39
Figura 9 Proteína total (g/L) quantificada nas borras de canola, milho e girassol nos 11 ensaios experimentais. ....	44
Figura 10 Comparação dos resultados de atividade lipásica (U/gms) dos experimentos com sem borra do DFC. ....	49
Figura 11 Comparação dos resultados de atividade específica (U/g de proteína) dos experimentos com e sem borra do DFC. ....	49
Figura 12 Superfície de resposta para a atividade lipásica (AL) em função das variáveis VSSA e concentração de nitrogênio. ....	52
Figura 13 Superfície de resposta para a atividade lipásica (AL) em função das variáveis concentração de nitrogênio e inóculo. ....	52
Figura 14 Superfície de resposta para a atividade lipásica (AL) em função das variáveis VSSA e concentração de inóculo. ....	53
Figura 15 Superfície de resposta para a atividade lipolítica em função das variáveis VSSA e nitrogênio. ....	58
Figura 16 Curva de contorno para a atividade lipolítica em função das variáveis VSSA e nitrogênio. ....	58
Figura 17 Superfície de resposta para a atividade específica aparente (AEA) em função das variáveis VSSA e nitrogênio. ....	59
Figura 18 Curva de contorno para a atividade específica aparente em função das variáveis VSSA e nitrogênio. ....	59

## LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>A.</b>	<i>Aspergillus</i>
<b>Aa</b>	Atividade de água
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance
<b>AOCS</b>	American Oil Chemists Society
<b>BC</b>	Borra de canola
<b>BM</b>	Borra de milho
<b>BG</b>	Borra de girassol
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>Ca<sup>++</sup></b>	Cálcio
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás carbnico (dióxido de carbono)
<b>Co<sup>+2</sup></b>	Cobalto
<b>Cu<sup>+2</sup></b>	Cobre
<b>CV%</b>	Coefficiente de variação
<b>Da</b>	Dalton (unidade de massa molecular)
<b>DCCR</b>	Delineamento central composto rotacional
<b>DNA</b>	cido desoxirribonucleico
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>Fe<sup>++</sup></b>	Ferro
<b>FES</b>	Fermentação no estado sólido
<b>FS</b>	Fermentação submersa
<b>g</b>	Grama
<b>g<sub>m</sub></b>	Grama de meio
<b>g<sub>ms</sub></b>	Grama de massa seco
<b>GRAS</b>	Generally recognized as safe
<b>h</b>	Horas
<b>IUB</b>	Uno Internacional de Bioquímica
<b>K<sup>+</sup></b>	Potássio
<b>kDa</b>	Quilodalton
<b>KOH</b>	Hidróxido de potássio
<b>L</b>	Litro
<b>Li</b>	Lítio
<b>mg</b>	Miligrama
<b>Mg<sup>++</sup></b>	Magnésio
<b>mL</b>	Mililitro
<b>min</b>	Minutos
<b>Mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>m/m</b>	Massa por massa
<b>m/v</b>	Massa por volume

<b>nm</b>	Nanômetro
<b>Na<sup>+2</sup></b>	Sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>RPM</b>	Rotação por minuto
<b>SAB</b>	Soro albumina bovina p. a.
<b>sp.</b>	Espécie
<b>spp.</b>	Espécies
<b>SB</b>	Experimento realizado sem a borra
<b>SSA</b>	Solução de sulfato de amônio
<b>U</b>	Unidade de atividade enzimática
<b>U/g<sub>ms</sub></b>	Unidade de atividade enzimática por grama de massa seco
<b>IU</b>	Unidade Internacional (para quantificação de atividade enzimática)
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VSSA</b>	Volume de solução de sulfato de amônio (mL)
<b>vvm</b>	Volume de ar por volume de meio por minuto
<b>v/v</b>	Volume por volume
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>mmol</b>	Micromol
<b>Zn<sup>++</sup></b>	Zinco
<b>&lt;</b>	Menor
<b>&gt;</b>	Maior

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	OBJETIVOS .....	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos .....	3
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1	Enzimas .....	4
3.1.1	Características gerais .....	4
3.1.2	Mercado mundial de enzimas.....	5
3.2	Lipases.....	6
3.3	Reações Catalisadas por Lipases.....	9
3.4	Aplicações das Lipases.....	11
3.4.1	Lipases na indústria de alimentos.....	11
3.5	Micro-organismos Produtores de Lipase.....	13
3.6	Fungos .....	14
3.6.1	<i>Aspergillus niger</i> .....	16
3.7	Processos Fermentativos.....	17
3.8	Biorreatores.....	19
3.8.1	Biorreatores de coluna .....	20
3.9	Resíduos Agroindustriais.....	21
3.9.1	Resíduos lignocelulósicos .....	21
3.9.2	Borra alcalina de óleo .....	22
3.10	Fatores que Influenciam a Produção de Lipase .....	23
3.10.1	Substrato e fonte de carbono .....	24
3.10.2	Fonte de nitrogênio .....	25
3.10.3	Indutores para produção de lipase .....	26
3.10.4	Inóculo .....	26
3.10.5	Atividade de água e umidade .....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1	Caracterização dos Indutores.....	28
4.1.1	Análises realizadas nas borras alcalinas de óleo de canola, milho e girassol.....	28
4.2	Produção da Enzima.....	30
4.2.1	Agente da fermentação.....	30
4.2.2	Meio de manutenção e ativação.....	30
4.2.3	Produção de conídios para fermentação.....	30
4.2.4	Preparo do inóculo .....	31
4.2.5	Meio para fermentação em estado sólido.....	31

4.2.6	Produção de lipase por fermentação em estado sólido .....	31
4.3	Delineamentos Experimentais Usados Durante a Produção de Lipase .....	31
4.3.1	Experimentos utilizando as borras de canola, girassol e milho .....	32
4.3.2	Experimento sem indutor .....	33
4.3.3	Experimento de otimização .....	33
4.4	Determinações Analíticas .....	34
4.4.1	Determinação da umidade .....	34
4.4.2	Proteína extracelular total.....	35
4.4.3	Determinação de atividade lipásica .....	35
4.4.4	Atividade lipásica específica aparente .....	36
4.4.5	Atividade proteásica.....	36
4.5	Análise Estatística .....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	37
5.1	Caracterização das Borras de Canola, Milho e Girassol .....	37
5.2	Produção da Enzima Lipase por <i>A. niger</i> 11T53A14 Utilizando FES.....	40
5.2.1	Seleção da melhor borra indutora através do DFF .....	40
5.2.2	Estudo dos efeitos das borras de canola, milho e girassol na atividade enzimática ..	45
5.2.3	Produção de lipase sem a presença de indutor (borra).....	48
5.2.4	Otimização da produção de lipase .....	53
5.2.4.1	Primeiro delineamento central composto rotacional (DCCR) 2 <sup>2</sup> .....	53
5.2.4.2	Segundo delineamento central composto rotacional (DCCR) 2 <sup>2</sup> .....	55
6	CONCLUSÕES .....	61
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	62
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	63

# 1 INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática é um campo promissor para a obtenção de compostos de alto valor agregado através de tecnologia mais limpa e uso de matérias-primas renováveis. Por este motivo, tem-se intensificado a busca por enzimas mais eficientes ou mesmo um *pool* enzimático concentrado que permita a sua utilização em diversos setores industriais.

As enzimas são biocatalisadores muito eficientes, quando comparados aos catalisadores convencionais, uma vez que apresentam especificidade ao substrato minimizando a formação de produtos secundários, reduzem o custo energético, pois atuam em condições brandas de processo e, adicionalmente, são biodegradáveis. Em contrapartida, os catalisadores orgânicos acumulam-se na natureza poluindo o meio ambiente.

Apesar das qualidades catalíticas inerentes às enzimas, suas vantagens e amplas aplicações, ainda existem limitações quanto ao seu uso em processos industriais, como os relacionados ao custo da produção desse catalisador e a dificuldade de atuação eficiente nas condições reais de processo. No entanto, pesquisas nessa área continuam crescendo, pois o desenvolvimento do processo de produção de enzimas, em escala industrial, de qualidade satisfatória e custos que permitam sua comercialização, requer um trabalho laborioso, caro e interdisciplinar. Faz-se necessário o conhecimento técnico-econômico da relação entre as diferentes etapas do processo que vão desde a obtenção da linhagem adequada, definição do melhor processo de fermentação, até a adequação dos métodos de recuperação e/ou purificação e concentração de enzimas.

Segundo a Sociedade Brasileira de Biotecnologia, em 2010, o mercado mundial de biocatalisadores foi superior a 4 bilhões de dólares, enquanto o mercado externo brasileiro estava em torno de 200 milhões, prevalecendo ainda as importações. À medida que o Brasil se afirma como um país em desenvolvimento torna-se necessário desenvolver internamente processos industriais competitivos frente aos que existem no mundo.

As enzimas lipases vêm se destacando no campo da biotecnologia enzimática, pois são uma alternativa para as sínteses químicas clássicas. Elas têm um alto poder catalítico na modificação de lipídeos esterificados, via hidrólise, esterificação e interesterificação, bem como na obtenção de ácidos graxos específicos ou glicerídeos de óleos vegetais. Suas características justificam a ampla aplicação nas indústrias de alimentos, de detergentes, farmacêutica e de cosméticos, no tratamento de efluentes, dentre outras.

Vários grupos brasileiros e estrangeiros têm procurado lipases com propriedades melhoradas e apropriadas à sua utilização como eficientes biocatalisadores de processos industriais. A escolha do micro-organismo, meio de cultivo e processos adequados, visa aumentar a produtividade e o rendimento, aperfeiçoar o processo, objetivando reduzir custos e ampliar a produção, saindo da escala de bancada para a produção em larga escala.

O fungo filamentoso *Aspergillus niger* é um bom produtor de enzimas, sendo capaz de produzir lipase extracelular, o que facilita a recuperação da enzima; são os principais fungos cultivados em meio sólido cujas características se assemelham aos meios naturais para o seu crescimento.

A técnica de fermentação em estado sólido (FES) é uma interessante alternativa para a produção de enzimas microbianas, devido à possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais e coprodutos como fonte de nutrientes e/ou de indução, bem como suporte para o desenvolvimento de micro-organismos. O aproveitamento destes resíduos e coprodutos agroindustriais para obtenção de produtos de valor comercial, através de processo FES, pode ser visto como uma tentativa de diminuir resíduos gerados pela



indústria, conseqüentemente, minimizar impactos ambientais, agregar valor a um produto de descarte e reduzir os custos para produção de enzimas.

As borras oriundas de refino de óleos vegetais são resíduos agroindustriais, recolhidos após a etapa de neutralização dos óleos. Elas são constituídas por sais de sódio de ácidos graxos e outras substâncias como água, triacilgliceróis, fosfolipídeos, matéria insaponificável e outros materiais não oleosos incorporados ao sabão. Borras de vários tipos de óleos podem ser usadas pelo fungo *A. niger* como indutores para produção da enzima lipase.

Os processos fermentativos envolvem uma série de variáveis e são afetados por diversos fatores, que incluem: tipo de substrato, composição do meio, aeração, umidade, temperatura, quantidade de inóculo, dentre outros. A decisão de adotar a metodologia do planejamento experimental para a realização de estudo envolvendo muitas variáveis, permite a verificação dos efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre as respostas, sequenciando para uma etapa de otimização do processo, com as melhores condições encontradas objetivando o aumento da atividade enzimática. E assim podem-se obter as condições ideais de melhor produção.

Dentro deste contexto, este projeto de pesquisa visou a produção da enzima lipase, obtida por uma linhagem mutante de *A. niger* 11T53A14, testando diferentes borras oriundas do refino de óleos vegetais em FES, usando delineamento experimental para verificar o efeito de algumas variáveis na produção da enzima.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Caracterizar as borras de refino de óleos vegetais e selecionar a melhor borra indutora na produção de lipase pelo fungo filamentoso mutante *Aspergillus niger* 11T53A14 por fermentação em estado sólido usando reator de colunas aeradas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Analisar quimicamente as borras alcalinas usadas como indutores quanto ao conteúdo de minerais, cinzas, umidade, óleo neutro, teor de sabão, pH e perfil em ácidos graxos;
- Produzir lipase através de fermentação em estado sólido, testando variáveis de processo em condições estabelecidas através de planejamento experimental;
- Correlacionar os resultados de produção de lipase com os de caracterização das borras;
- Comparar a produção da lipase com e sem a presença de indutor;
- Otimizar a produção utilizando a borra com melhor capacidade indutora.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Enzimas

#### 3.1.1 Características gerais

As enzimas são proteínas com atividade catalítica que exercem a função de acelerar ou possibilitar reações entre os componentes químicos. Estão presentes em todos os sistemas biológicos e são produzidas por todos os organismos vivos (CANTO e MENEZES, 1995). Atualmente são o principal alvo das pesquisas em biotecnologia, não apenas por seu papel crucial nos mecanismos celulares, mas também por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais (SENA et al., 2006).

As enzimas são formadas por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. A conformação e a estabilização da estrutura molecular são asseguradas por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de van der Waals. As condições de pH, temperatura e força iônica do meio afetam a estrutura da enzima e conseqüentemente suas propriedades (LIMA et al., 2001).

A estrutura molecular da enzima é constituída majoritariamente por uma parte proteica, e contém um centro ativo denominado apoenzima, que pode ou não estar integrada a outras moléculas de natureza não proteica denominada coenzima. A molécula toda (apoenzima e coenzima) recebe o nome de haloenzima. Algumas enzimas requerem a participação de moléculas orgânicas de baixo peso molecular (cofatores), ou íons metálicos ( $Fe^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ) que juntamente com a proteína formam catalisador ativo ou seja, ativam as enzimas a eles ligadas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

A catálise enzimática é caracterizada por boa capacidade de regular a atividade sob ação de efeitos ativadores e inibidores e alta especificidade de substrato, ou seja, seletividade com relação a ligações específicas do substrato, proporcionando maiores rendimentos de reação e formando produtos seletivamente. Essas vantagens implicam em produto final com quantidades mínimas de subprodutos derivados de reações secundárias, garantindo benefícios econômicos e ambientais (BON, FERRARA e CORVO, 2008). Outras vantagens do ponto de vista industrial, são as condições brandas de temperatura, pressão e pH, que as enzimas operam, o que contribui para economia de energia e, adicionalmente, as enzimas são biodegradáveis. Contudo, essas características tornam os catalisadores biológicos superiores em contraste com os catalisadores químicos convencionais (KRAJEWSKA, 2004) como: ácidos, bases, metais pesados e óxidos metálicos (BON, FERRARA e CORVO, 2008).

A expressão da atividade enzimática é medida através de sua velocidade de reação, determinada em condições experimentais estabelecidas. A concentração de produto formado aumenta linearmente com o tempo num dado intervalo (velocidade inicial de reação). No entanto, a partir de certo tempo, a velocidade decresce devido a fatores como: diminuição da concentração de substrato e inibição por produto. A atividade enzimática é expressa em unidade de atividade (U), definida pela unidade internacional (IU) como a quantidade de enzima que catalisa a síntese de 1 micromol de produto por minuto (LIMA et al., 2001) em condições ótimas.

As enzimas são divididas em seis classes, baseadas no tipo de reação que elas catalisam (Tabela 1). Essa classificação foi uniformizada pela Comissão de Enzima da União Internacional de Bioquímica (I.U.B.) (CARNEIRO, 2003).

**Tabela 1** Classificação das enzimas baseado no tipo de reação que catalisam.

<b>Classificação</b>	<b>Reação que catalisam</b>	<b>Enzimas</b>
Oxido-redutases	reações de óxido-redução. Transferência de átomos de O e H ou elétrons de um substrato para o outro.	hidrogenase; oxidase; peroxidase; hidroxilases; oxigenases.
Transferases	reações de transferência de grupos específicos de um composto para o outro.	aminotransferases; acetiltransferase; cinases; fosforilases.
Hidrolases	reações hidrolíticas	lipases; proteases; amilases; pectinases.
Liasas	reações reversíveis, não hidrolíticas de remoção de grupos da molécula de substrato.	descarboxilases; aldolases
Isomerases	reação de isomerização transformam isômeros entre si (cis e trans).	glicose-isomerase.
Ligases	reação de síntese de novos compostos, derivados da junção de duas moléculas.	piruvato carboxilase

Fonte: CARNEIRO, 2003.

As enzimas podem ser de origem animal, vegetal e microbiana. As enzimas microbianas apresentam maior interesse, do ponto de vista da sua aplicação industrial, por serem mais facilmente produzidas em larga escala, via fermentação, por serem mais facilmente expressas (clonagem) em organismos de cultivo já estabelecido e pela enorme diversidade microbiana existente que oferece infinitas possibilidades de modos de ação, nas mais diversas condições (SENA et al., 2006).

Aproximadamente 95% dos processos enzimáticos empregados atualmente utilizam hidrolases e dentre as enzimas hidrolíticas de maior interesse, 5-10% cabem as lipases, pois são extremamente versáteis e catalisam várias reações em diversos substratos, quando comparadas às outras hidrolases (GOLDBECK, 2008).

### 3.1.2 Mercado mundial de enzimas

Em decorrência das necessidades e tendências da substituição das múltiplas etapas de processos químicos por processos biotecnológicos mais eficientes e da substituição de processos químicos baseados em insumos não renováveis por processos químicos ou bioquímicos que utilizem insumos renováveis, prevê-se aumento significativo do consumo de enzimas a nível internacional (POLITZER e BON, 2006).

O mercado de enzimas especiais pode ser dividido em quatro segmentos: enzimas terapêuticas (anticoagulantes, antitumorais, antivirais, antibióticos, anti-inflamatórios e outras); enzimas utilizadas em diagnósticos; enzimas para pesquisa científica; e enzimas para química fina. Já o mercado de enzimas industriais está dividido em três grandes segmentos: enzimas técnicas, destinadas principalmente à indústria têxtil e de produtos de limpeza; enzimas para alimentos e bebidas, em constante crescimento devido à procura por novas aplicações na área de laticínios e panificação; e enzimas para ração animal, cujo crescimento tem sido acelerado devido ao grande interesse dos criadores de aves e suínos

em aumentar o valor nutricional da ração e facilitar sua digestibilidade (BON, FERRARA e CORVO, 2008).

As principais enzimas de aplicação industrial são proteases, amilases, lipases, celulasas, xilanases e fitases, (MUSSATTO, FERNANDES e MILAGRES, 2007) e as maiores empresas produtoras líderes do mercado são: a empresa multinacional de biotecnologia Novozymes (com sede na Dinamarca), Gist-Brocades (com sede na Holanda) e Genencor International Inc (com sede nos EUA). A primeira é a maior fornecedora e, em 2009, deteve sozinha 47% do mercado de enzimas industriais e seus principais segmentos de mercado são: alimentos (produtos lácteos, panificação e bebidas), alimentação animal e aplicações técnicas (FOCUS ON CATALYSTS, 2011).

Nos Estados Unidos a venda de enzimas vai aumentar 4,8% ao ano, chegando a 2,8 bilhões de dólares em 2014, de acordo com um estudo realizado pela empresa de pesquisa Freedonia Group. Esse crescimento tem maior impacto sobre as enzimas especiais usadas em aplicação, como produto farmacêutico, biotecnologia e pesquisa, e biocatalisadores em mercado de biocombustível. Em termos de venda, as enzimas carboidrases continuam sendo as mais vendidas (FOCUS ON CATALYSTS, 2010a).

Embora as enzimas especiais estejam ganhando mais espaço, as enzimas industriais para processamento de papel, ração animal, cosméticos e artigos de higiene e produto de limpeza, continuam tendo crescimentos estáveis no mercado (FOCUS ON CATALYSTS, 2010b). Na Índia, as indústrias de detergente e farmacêutica ocupam 50% do mercado de enzimas, seguido da indústria têxtil, e o mercado de enzimas foi de 100 milhões de dólares em 2009 e deverá chegar a 163 milhões de dólares em 2015 (FOCUS ON CATALYSTS, 2010b).

A tecnologia enzimática concilia desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias-primas renováveis e a preservação ambiental, cenário importante para a inserção do Brasil no mercado internacional (POLITZER e BON, 2006).

O mercado brasileiro de enzimas, embora ainda pouco representativo (cerca de 2% do total mundial), revela grande potencial, devido à enorme geração de resíduos agroindustriais e ao dinamismo das indústrias de alimentos, medicamentos, tecidos e celulose/papel. A redução do custo de produção de enzimas é favorecida, no país, pela possibilidade de bioconversão de subprodutos agrícolas como farelo de trigo, farelo de algodão, casca de soja e outros (MUSSATTO, FERNANDES e MILAGRES, 2007).

A fábrica brasileira Bioenzima, fundada em Caruaru há 13 anos, tem capacidade para produzir 20 toneladas de enzimas por mês, menos de 2% do que o país demanda, e atende às indústrias de ração animal, panificação e às lavanderias de envelhecimento de jeans, essa última responde, em média, por 20% do consumo nacional de enzimas (RAMOS, 2009).

Resultado da fusão da empresa brasileira Novo Industri com a dinamarquesa Nordisk Gentoft e em 1989, a Novozymes Latin America Ltda possui uma unidade no país, localizada em Araucária- PR. Com mais de 700 produtos, a empresa fornece enzimas para diversas indústrias, como têxtil, alimentícia e cervejeira, além de enzimas para o mercado de combustíveis. A empresa visa um desenvolvimento contínuo de um caminho tecnológico para produzir etanol de segunda geração a partir de celulose no Brasil (KIRIHATA, 2010).

### **3.2 Lipases**

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas lipolíticas, pertencentes ao grupo das hidrolases, cuja função biológica é catalisar a hidrólise de

ésteres de glicerol e ácidos graxos de cadeias longas, produzindo monoacilglicerol, diacilglicerol e ácidos graxos livres. Estas enzimas também são usadas para catalisar a síntese de ésteres e para reações de transesterificação (JAEGER et al., 1993). Atuam tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico, com teores de água restrito. São definidas como carboxilesterases que atuam em substratos emulsificados (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004).

As lipases são as enzimas mais utilizadas em síntese orgânica e mais de 20% das biotransformações são realizadas utilizando-as (JAYAPRAKASH e EBENEZER, 2010). Estão na terceira posição em vendas, perdendo para proteases e amilases (RIGO et al., 2010).

Antigamente, as lipases eram obtidas somente a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano. Esta descoberta foi feita por Claude Bernard em 1856, no entanto às dificuldades de acesso ao material de origem animal culminou, anos mais tarde, pela substituição por outras fontes produtoras dessa enzima. (CASTIGLIONI, 2009).

Somente as enzimas de origem microbianas são comercialmente utilizadas, uma vez que constituem um importante grupo de enzimas e, além disso, possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como o menor custo de produção, a possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, além de oferecer amplo espectro de características físico-químicas. Devido à versatilidade de suas propriedades e à fácil produção em massa, são amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade ao substrato, o que as torna muito atrativas para a aplicação industrial (ROVEDA, HEMKEMEIER e COLLA, 2010). São estáveis a temperatura e ao pH (JAYAPRAKASH e EBENEZER, 2010) e ativas em meio aquoso e não aquoso (GUTARRA et al., 2009).

As lipases microbianas são glicoproteínas de peso molecular variando entre 19 e 60 kDa, apresentando em torno de 258 e 544 resíduos de aminoácidos, dos quais grande número são hidrofóbicos e responsáveis pela interação entre a enzima e substratos insolúveis em água (AMARAL, 2007).

As lipases diferenciam-se uma das outras devido as suas características físico-químicas e propriedades bioquímicas, tais como: especificidade pelo substrato, condições ótimas de reação, sensibilidade a inibidores e necessidade de ativadores. A especificidade é um fator crucial na determinação de suas aplicações em potencial para processos industriais. A descoberta de lipases com especificidade comprovada, diferentes das já reportadas na literatura, através de programas de isolamento e seleção, poderia ampliar o seu campo de aplicação nas áreas de química fina e de óleos e gorduras (GOLDBECK, 2008). Além da especial importância nas reações de transformação e interesterificação, uma vez que os produtos formados podem ser mais facilmente obtidos por via enzimática do que em processos químicos convencionais (MALDONADO, 2006).

Esta propriedade, de atuarem seletivamente sobre seus substratos, depende da fonte da enzima e apresentam, a exemplo das demais propriedades gerais, grande diversidade (GOLDBECK, 2008).

As lipases podem ser classificadas em três grupos baseados na sua especificidade em relação ao substrato: o primeiro grupo compreende as lipases regiosseletivas que são subdivididas em: lipases inespecíficas, que hidrolisam moléculas de acilgliceróis em posições aleatórias, produzindo ácidos graxos livres e glicerol com mono e diacilgliceróis como intermediários. Os produtos seriam semelhantes aos gerados pelos catalisadores químicos com a exceção do menor produto termodegradado, devido à baixa temperatura de reação em biocatalises; e as lipases 1,3 específicas, catalisam a liberação de ácidos graxos

nas posições 1 e 3 do glicerol. Neste caso, apenas determinado tipo de ácido graxo é liberado de moléculas de acilgliceróis (YAHYA, ANDERSON e MOO-YOUNG, 1998). O segundo grupo são as lipases tipo-seletivas com relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturações do grupo acila (PAQUES e MACEDO, 2006). O terceiro grupo são as lipases que catalisam derivatização enantiosseletiva de compostos quirais e uma série de reações de esterificação, transesterificação e interesterificação (YAHYA, ANDERSON e MOO-YOUNG, 1998).

Embora as lipases de diferentes fontes sejam capazes de catalisar a mesma reação, elas podem diferir no desempenho sob as mesmas condições de reação (YAHYA, ANDERSON e MOO-YOUNG, 1998).

Comercialmente as lipases são produzidas por diversas empresas e a partir de diversas fontes, conforme ilustrado na Tabela 2.

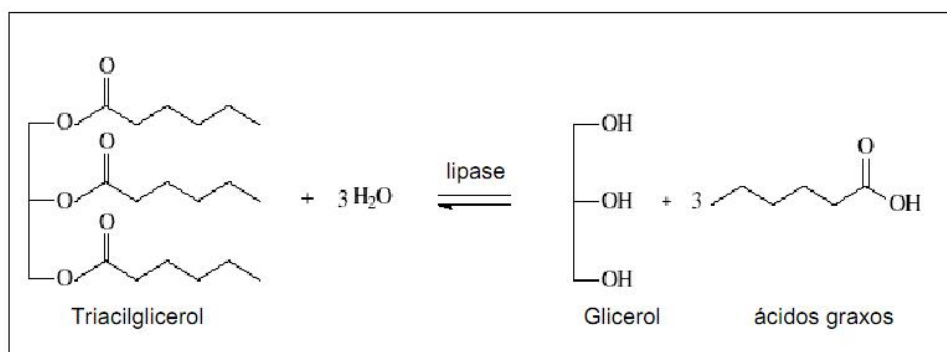
**Tabela 2** Lipases comerciais produzidas por diferentes micro-organismos.

<b>Fonte</b>	<b>Fornecedor</b>
<i>Achromobacter</i> sp.	Meito Sangyo
<i>Aspergillus niger</i>	<b>Aldrich, Amano, Biocatalysts, Fluka, Novozymes, Röhm</b>
<i>Aspergillus</i> sp	<b>Novozymes</b>
<i>Candida antarctica A</i>	Boehringer, Fluka, Novozymes
<i>Candida antarctica B</i>	Fluka, Novozymes, Boehringer
<i>Candida cylindracea</i>	Meito
<i>Candida rugosa</i>	Aldrich, Altus, Amano, Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Meito Sangyo, Sigma, Roche
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Asahi
<i>Geotrichum candidum</i>	Amano, Biocatalysts
<i>Mucor javanicus</i>	Amano
<i>Mucor miehei</i>	Amano, Boehringer, Biocatalysts, Fluka, Novozymes
<i>Penicillium roqueforti</i>	Amano, Biocatalysts, Fluka
<i>Pseudomonas</i> sp.	Amano, Boehringer, Fluka, Mitsubishi, Röhm, Sigma
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Sigma
<i>Rhizopus oryzae</i>	Amano, Sigma
Germe de trigo	Fluka, Sigma
Pâncreas de suíno	Aldrich, Amano, Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Röhm, Sigma

Fonte: PAQUES e MACEDO, 2006.

### 3.3 Reações Catalisadas por Lipases

Embora a função natural da enzima lipase seja a de hidrolisar as ligações éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (Figura 1), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa (OLIVEIRA, ALVES e CASTRO, 2000) em ambientes com pouca água e presença de solventes orgânicos, como esterificação (reação entre alcoóis e ácidos carboxílicos com a eliminação de água), transesterificação, (interesterificação, alcoólises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular), sendo que a atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação (Figura 2) (PAQUES e MACEDO, 2006).



**Figura 1** Reação de hidrólise de triacilglicerol catalisada por lipases.

Fonte: KAMINI, MALA e PUVANAKRISHNAN, 1998.

Os substratos naturais das lipases são triacilgliceróis com ácidos graxos de cadeias longas. Essas enzimas atuam na interface entre a região hidrofóbica e hidrofílica (interface óleo-água), características que distinguem as enzimas lipases das esterases (YAHYA, ANDERSON e MOO-YOUNG, 1998). Esse fenômeno é uma característica única estrutural desta classe de enzimas (REETZ, 2002).

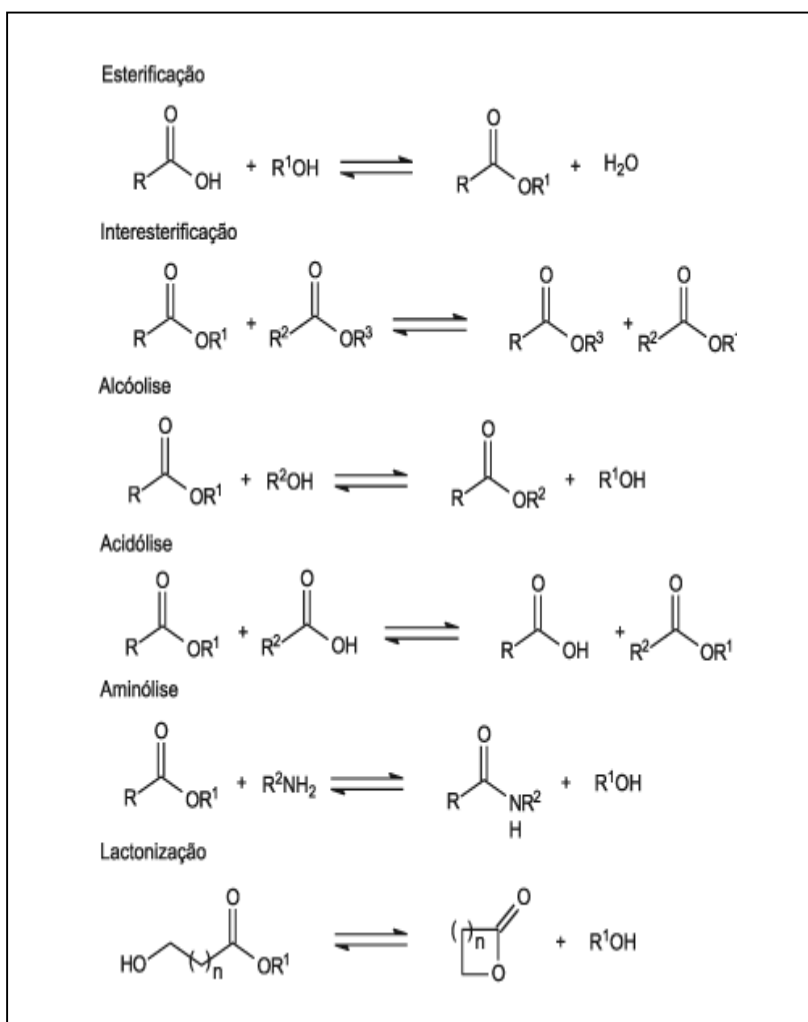
Em meio aquoso, ocorre a hidrólise do substrato. Essa reação ocorre via hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, gerando uma mistura reacional que contém água, glicerol, ácidos graxos, diacilgliceróis e monoacilgliceróis. As reações lipolíticas ocorrem na interface água-lípido podendo, em alguns casos, impedir que as cinéticas das reações enzimáticas sejam descritas pelas equações do tipo Michaelis-Menten, que só são válidas se a reação catalítica ocorrer em fase homogênea (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004). Assim, as reações catalisadas por lipases são analisadas, em geral, utilizando-se o substrato lipídico sob a forma de emulsão (GONÇALVES, 2007). A ativação interfacial relaciona o aumento significativo da atividade da enzima lipase em presença de uma emulsão com substratos insolúveis (triacilgliceróis) (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999).

A determinação da estrutura tridimensional da lipase fornece uma explicação para a ativação interfacial. O sítio ativo das lipases é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa (ou borda). Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004).

O termo interesterificação refere-se à troca de radicais acil entre éster e ácido carboxílico (acidólise), entre éster e álcool (alcoólise), ou éster e outro éster



(transesterificação). Nessas reações o triacilglicerol reage com ácido graxo, álcool ou outro éster, resultando num rearranjo dos grupos dos ácidos graxos do triacilglicerol de forma a produzir um novo triacilglicerol. O rearranjo é o resultado de reações concorrentes de hidrólise e esterificação. A concentração ótima de água no meio reacional deve ser suficientemente baixa de forma a minimizar a formação de produtos de hidrólise indesejáveis, mas deve ser suficiente para que a enzima permaneça totalmente ativa (GOLDBECK, 2008).



**Figura 2** Reações reversíveis catalisadas pela lipase.

Fonte: PAQUES e MACEDO, 2006.

A enzima, na forma sólida e completamente sem a camada de hidratação, pode ter a capacidade de se manter ativa no meio orgânico, possivelmente devido à formação, na superfície da partícula sólida de enzima, de uma camada de proteína desnaturada, que protege as camadas interiores do contato com o solvente orgânico (FERNANDES, 2007).

Nas reações de esterificação e hidrólise, o teor de água afeta a posição de equilíbrio da reação, bem como a distribuição dos produtos no meio. A presença de água é um problema para reações de transesterificação, pois favorece a reação inversa (hidrólise de éster) (YAHYA, ANDERSON e MOO-YOUNG, 1998).

### 3.4 Aplicações das Lipases

As lipases extracelulares têm provado serem eficientes e seletivas em muitas aplicações industriais (MHETRAS, BASTAWDE e GOKHALE, 2009). A flexibilidade da lipase em catalisar diversas reações, aliada aos diferentes tipos de especificidade aos substratos existentes entre as diversas lipases confere a estas enzimas um potencial enorme de aplicação (PASTORE, COSTA e KOBLITZ, 2003).

As várias aplicações das lipases incluem: hidrólise e modificação de gorduras e óleos, atuação nas indústrias de couros (remoção de gordura de peles de animais) (KO, WANG e ANN, 2005), tratamento de efluentes industriais (remoção de produtos oleosos), na indústria farmacêutica (remédios e digestivos) (MALDONADO, 2006), cosmética (ROVEDA, HEMKEMEIER e COLLA, 2010), além de poder ser utilizada como biocatalisador para a síntese de polímeros como polifenóis, polissacarídeos e poliésteres, com a vantagem de ter alta seletividade. Pode originar o biodiesel, uma fonte alternativa de energia que pode ser produzido bioquimicamente por uma reação de transesterificação, utilizando a enzima lipase, a partir de óleos vegetais. Estas enzimas também são eficientes na produção de herbicidas usados contra ervas daninhas na produção de arroz (JAEGER e EGGERT, 2002). A lipase ainda encontra uso como aditivos em indústrias para obtenção de produtos para lavanderias e detergentes domésticos, pois são capazes de hidrolisar gorduras em diversas composições e resiste às condições de lavagem severas (pH 10-11 e 30-60°C). Na indústria de celulose e papel, as lipases são usadas para remover os componentes hidrofóbicos da madeira que causam problemas na fabricação desses produtos. Em síntese orgânica, o uso de lipase está se tornando cada vez mais importante, pois elas são usadas para catalisar variadas transformações químio-, regio-, e estereosseletiva (SHARMA, CHISTI, BANERJEE, 2001). Alguns exemplos podem ser visualizados na Tabela 3.

Além das aplicações em indústrias, as lipases estão ligadas à deterioração de alguns produtos, principalmente de laticínios e de óleos comestíveis (PASTORE, COSTA e KOBLITZ, 2001). Uma vez que, ao hidrolisar a gordura do leite e o óleo, a lipase libera ácidos graxos aumentando a acidez nesses alimentos.

#### 3.4.1 Lipases na indústria de alimentos

Óleos e gorduras são importantes constituintes de alimentos. O valor nutricional e sensorial e as propriedades físicas dos triacilgliceróis são altamente influenciados por fatores como a posição do ácido graxo, comprimento da cadeia e grau de insaturação. A lipase modifica as propriedades dos lipídeos alterando a localização das cadeias de ácidos graxos e substituindo um ou mais ácidos graxos (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

Inúmeros ésteres são considerados de grande importância na vida cotidiana. Produtos naturais, tais como triacilgliceróis, fosfolipídeos, esteróides e aromatizantes apresentam em comum uma ligação éster, apesar das diferentes propriedades físicas e diversas estruturas químicas que possuem. As lipases podem catalisar a síntese de ésteres de poliglicerol. Esses tipos de ésteres são ingredientes multifuncionais, sendo usados como emulsificantes, substitutos de gorduras, como meio de solubilização de vitaminas lipossolúveis para facilitar a incorporação destas em sistemas lipofílicos, e também podem ser utilizados em sorvetes, margarinas, coberturas e sobremesas (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004).

**Tabela 3** Aplicação industrial das lipases.

<b>Setor</b>	<b>Área</b>	<b>Efeito Utilizado</b>	<b>Produto</b>
<b>Alimentício</b>	laticínio	hidrólise da gordura do leite	agente aromatizante para produtos lácteos
	panificação	melhoramento do sabor e/ou qualidade, prolongamento do tempo de prateleira	confeitos e bolos
	bebidas	melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídeos	bebidas alcoólicas (vinho e outras)
	processamento de derivados do ovo	melhoramento da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos	maionese, molhos e crèmes
	processamento de carne e peixe	desenvolvimento de aromas e remoção de excesso de gorduras	produtos embutidos
	processamento de óleos	transesterificação de óleos naturais; hidrólise de óleos (ácidos graxos), diacilglicerol	óleos e gorduras modificadas (substitutos da manteiga de cacau)
<b>Químico</b>	química fina	síntese de ésteres	ésteres
	detergentes	remoção de manchas de óleo e gorduras	gorduras
	farmacêuticos	digestão de óleos e gorduras de alimentos	digestivos
	analítico	análise de triacilglicerol no sangue	Diagnostico
	cosmético	remoção de lipídeos	cosméticos em geral
	curtume	remoção de gorduras das peles de animais	produtos de couro
	diversos	decomposição e remoção de substâncias oleosas	limpeza de tubulação, tratamento de efluentes

Fonte: GOLDBECK, 2008.

Os ésteres resultantes das reações entre ácidos de cadeia longa com alcoóis de cadeia curta (2-8 átomos de carbono) são utilizados como aditivos. Os ésteres de sacarose, por exemplo, são conhecidos como bons emulsificantes (FERNANDES, 2007).

Os ésteres produzidos a partir de ácidos graxos de cadeia curta têm aplicação como agentes flavorizantes, e no processamento de química de óleo. O uso dessa enzima economiza energia e minimiza a degradação térmica durante a alcoólise, acidólise, hidrólise e glicerólise. Um dos mais importantes usos das lipases, em processos de interesterificação de óleos e gorduras, é o aproveitamento de óleos de baixo valor agregado para produção de análogos de manteiga de cacau, aditivo que confere ao chocolate as características necessárias de cristalização e fusão. Geralmente, os produtos de chocolate contêm 30% desse ingrediente. A manteiga de cacau contém 26% de ácido palmítico (C 16:0) e 34% de esteárico (C 18:0) e o processo visa substituir o ácido palmítico (57%) em óleo de palma pelo ácido esteárico (6%) (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

Na área de panificação, as lipases podem produzir mono e diacilgliceróis provenientes da adição de lipídeos, melhorando o volume específico, maciez do miolo e, conseqüentemente, retardando o envelhecimento dos pães. Além disso, essas enzimas proporcionam aumento da elasticidade e fortalecimento da massa. A adição de lipases pode produzir pequenas quantidades de ácidos graxos livres de cadeia curta, que influenciam o aroma do pão (GANDRA et al., 2008).

Na indústria de laticínios, as lipases são largamente utilizadas na hidrólise da gordura do leite, na aceleração dos processos de maturação de queijos e no desenvolvimento de aromas e sabores. No processo de fabricação de queijos, a gordura do leite é hidrolisada e libera ácidos graxos que contribuem diretamente no aroma e agem como precursoras para metil cetonas, alcoóis secundários e ésteres alifáticos e aromáticos (ALBERTON, 2009). Na manufatura de queijos duros da variedade italiana, como o *provolone*, o sabor deve-se aos ácidos graxos de cadeia curta, produzidos pela ação das lipases do coalho de bezerro (BON, FERRARA e CORVO, 2008).

A adição de lipase exógena acelera o processo de maturação do queijo, entretanto, a adição de lipases livres ao processo pode conduzir à lipólise excessiva, resultando em problemas na textura e no sabor (ALBERTON, 2009). Em alguns queijos “embolorados” como *roquefort*, são utilizadas enzimas lipases produzidas por *Penicillium roqueforti* para obtenção do sabor característico (BON, FERRARA e CORVO, 2008).

As lipases têm sido utilizadas para o desenvolvimento de sabores em bebidas (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001). Em bebidas alcoólicas atuam no melhoramento do aroma e aceleração da fermentação por remoção dos lipídeos (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004).

Lipases são usadas para auxiliar a remoção da gordura de produtos de carne e peixe (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001). Elas são usadas no para desengordurar ossos usados na produção de gelatina. Para isso são empregadas preparações de lipase de *Rhizopus arrhizus*, desprovidas de atividade proteásica (BON, FERRARA e CORVO, 2008).

Enzimas lipases também podem ser utilizadas no processamento de derivados de ovo como maionese, molhos e cremes, melhorando a qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004).

### 3.5 Micro-organismos Produtores de Lipase

Diversos micro-organismos são capazes de sintetizar enzimas de interesse comercial. Normalmente, mais de um tipo de enzima hidrolítica é sintetizada, garantindo deste modo o consumo de vários tipos de substratos e a subsistência do micro-organismo. Entretanto, a triagem de micro-organismos produtores de enzimas é de grande importância para a seleção de novas enzimas, mais estáveis e seletivas (GOLDBECK, 2008).

Os micro-organismos produtores de lipases são encontrados em diversos *habitats*, como em rejeitos de indústrias de processo de óleos vegetais e de laticínios, solos contaminados com óleo, sementes oleaginosas e alimentos apodrecidos (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001). O solo possui reservatório diversificado de populações microbianas de onde podem ser isolados micro-organismos para posterior avaliação da sua capacidade para a produção das enzimas (KO, WANG e ANN, 2005).

Os micro-organismos de interesse industrial podem ser obtidos das seguintes formas: isolamento a partir de recursos naturais, compra em coleções de culturas, obtenção de mutantes naturais, obtenção de mutantes induzidos por métodos convencionais e obtenção de micro-organismos recombinantes por técnicas de engenharia genética (SCHMIDELL et al., 2001).

As possíveis limitações encontradas na aplicação sintética de enzimas em sua forma nativa estão sendo contornadas através da alteração da estereoespecificidade, termoestabilidade e atividade envolvendo técnicas de biologia molecular (CONTI, RODRIGUES e MORAN, 2001).

A variabilidade genética é um dos mecanismos de evolução utilizados pelos seres vivos e pode ser alcançada pelos fungos através de mutação. Vários são os métodos para produzir mutações no DNA. Esses variam desde os métodos físicos como: radiação ultravioleta e radiação ionizante (raio x); químicos como: ácido nitroso, hidroxilamina, agentes alquilantes monofuncionais (etilmetanosulfonado) e até os métodos mais sofisticados, que envolvem a manipulação direta do DNA (BORBA et al., 2007).

### 3.6 Fungos

A diversidade microbiana dos fungos é muito grande, estimando-se o número de espécies entre 100.000 e 250.000. Esses micro-organismos destacam-se pela sua capacidade de atacar tecidos vegetais através da secreção de enzimas que degradam biopolímeros, tais como polissacarídeos, lignina e proteínas (NEI, BON e FERRARA, 2008).

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos e multicelulares com exceção das leveduras. Reproduzem-se naturalmente por meio de esporos, com poucas exceções (BOSSOLAN, 2002; TRIBST, 2008).

Os fungos na sua maioria são mesófilos, isto é, apresentam faixa ótima de temperatura de crescimento entre 25-40°C. Alguns toleram temperaturas próximas ao congelamento da água e outras temperaturas acima de 40°C (termotolerantes). A temperatura afeta os diferentes parâmetros de crescimento microbiano, como, o tempo de adaptação (fase lag), a velocidade específica de crescimento e o rendimento em células, bem como influencia tanto o metabolismo primário, quanto o secundário de vários modos (GONÇALVES, 2007).

A classificação dos fungos é baseada principalmente nas características dos esporos sexuais e dos corpos de frutificação, na natureza de seus ciclos de vida e nas características morfológicas de seus micélios vegetativos ou de suas células (BOSSOLAN, 2002).

Os micro-organismos do gênero *Aspergillus* são classificados como deuteromicetos, classe conhecida como bolores imperfeitos que possuem apenas a forma assexuada de reprodução, através dos conídios gerados nos conidióforos, que ficam localizados no final das hifas. As hifas dos micélios de reprodução são aéreas, em geral, enquanto algumas hifas do micélio vegetativo podem penetrar no meio em busca de nutrientes (BOSSOLAN, 2002).

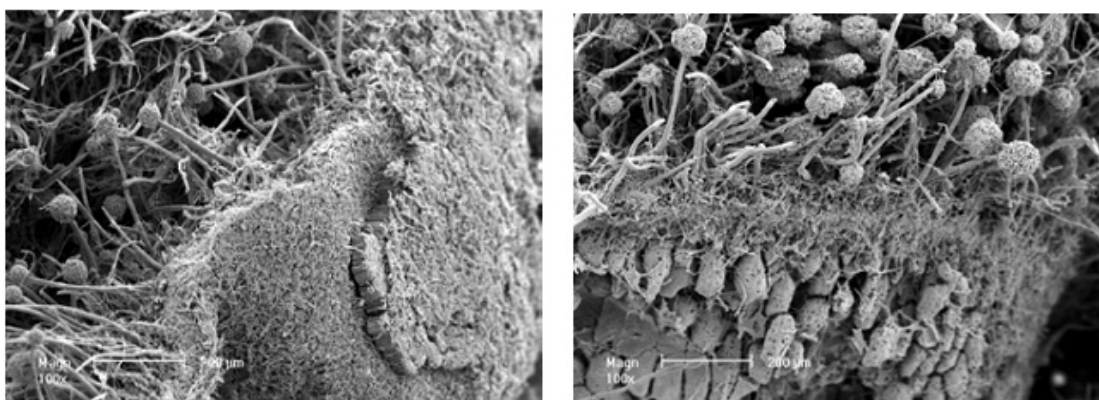
Esse gênero pode ser diferenciado dos demais deuteromicetos por apresentar crescimento relativamente rápido e, por ter a cor da colônia caracterizada pela cor dos conídios de cada espécie (TRIBST, 2008).

A denominação fungos filamentosos abrange os fungos formados por hifas (filamentos tubulares microscópicos) que formam revestimentos esbranquiçados ou coloridos, sobre o substrato onde crescem. As células, ricas em exo e endoenzimas, são tubuliformes e formam hifas, que podem ser uni ou pluricelulares. Um emaranhado de hifas constitui o micélio (MENEZES, 2006). Os micélios podem ser vegetativos ou de reprodução, sendo estes responsáveis pela produção de esporos (BOSSOLAN, 2002). A parede celular destes filamentos é composta por quitina e hemicelulose (MENEZES, 2006).

Os fungos filamentosos são amplamente distribuídos e geralmente desenvolvem-se em materiais sólidos, tais como, plantas e solos. Estes organismos produzem, com eficiência, diferentes enzimas para degradar estes materiais sólidos e utilizar os nutrientes para a sobrevivência (HÖLQUER, HÖFER e LENZ, 2004). A absorção desses nutrientes é favorecida pelo modo de adesão dos fungos às partículas do substrato, durante o crescimento (MENEZES, 2006). A hifa emerge do esporo, infiltra-se no alimento e outra hifa estende-se no ar. As células das hifas secretam enzimas digestivas, degradando compostos orgânicos em pequenas moléculas que serão absorvidas pelos fungos (BOSSOLAN, 2002).

Alguns fungos têm apêndices especiais para agarrar às superfícies, outros contam com adesivos secretados de polissacarídeos, ou ambos os sistemas. Devido à complexidade dos substratos, há necessidade de um complexo de enzimas especiais para sua degradação, cuja composição depende do fungo (TENGERDY e SZAKACS, 2003).

Na fermentação em estado sólido (FES), o crescimento acontece pela extensão das pontas das hifas (MENEZES, 2006) sobre a superfície sólida das partículas de matéria orgânica que penetram nos espaços interpartículas, e assim colonizam o substrato sólido (Figura 3) (GRAMINHA et al., 2008), sendo a direção e a velocidade do crescimento determinadas pela disponibilidade dos nutrientes e pelas características do substrato (MENEZES, 2006).



**Figura 3** Morfologia de fungos filamentosos em fermentação em estado sólido. Micélios de fungos com esporos cultivados em substrato sólido. A foto da direita mostra que o micélio fúngico penetra através do grão.

Fonte: WANG e YANG, 2007.

Os fungos filamentosos são os melhores produtores de lipases (SILVA, CONTESINI e CARVALHO, 2008), e têm sido empregados na indústria de fermentação como os micro-organismos mais importantes utilizados na produção de enzimas e antibióticos (WANG e YANG, 2007).

As espécies de fungos mais produtivas pertencem aos gêneros *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Aspergillus* e *Penicillium* (SILVA, CONTESINI e CARVALHO, 2008).

### 3.6.1 *Aspergillus niger*

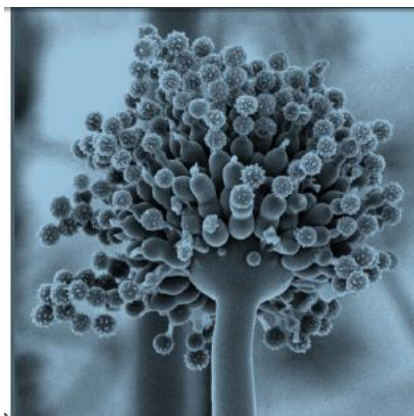
Existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar. Dentre as espécies mais conhecidas, encontram-se o *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor* (SOARES et al., 2010). Espécies como *A. niger* são conhecidas por seu uso em produção de alimentos e biotecnologia moderna (KAAIJ, 2007).

*Aspergillus* spp. são grandes produtores de enzimas, como celulasas, xilanases (AGUIAR e MENEZES, 2000), amilases, proteases (PAPAGIANNI e MOO-YOUG, 2002), fitase (PAPAGIANNI, NOKES e FILER, 1999), poligalacturonase (SOUZA et al., 2010), pectinases (SURESH e VIRUTHAGIRI, 2010) e lipases (JAYAPRAKASH e EBENEZER, 2010). Estão entre os mais conhecidos produtores de lipase (MAHADIK et al., 2002), pois possuem boa capacidade de fermentação, altos níveis de secreção de enzimas (AGUIAR, 2010) e a taxa de crescimento destes fungos é moderadamente rápida a rápida. Suas colônias podem apresentar coloração branca, rosada, amarela, amarelo-verdeada, amarronzada ou verde (SOARES et al., 2010).

A maioria das lipases de *Aspergillus* apresenta pH ótimo entre 5,0 e 6,0. As lipases de fungos são geralmente ativas e estáveis a 40-50°C (MHETRAS, BASTAWDE e GOKHALE, 2009).

O *Aspergillus niger* é um fungo comum do solo, observado como bolor negro em frutas e outros alimentos. Embora esta espécie seja geralmente não-patogênica, a inalação de grande quantidade de esporos pode levar à doença pulmonar (aspergilose). A ingestão oral de *A. niger* foi considerada como inofensiva pela Organização Mundial de Saúde, o que abriu a oportunidade para sua utilização na produção industrial de ácidos, produtos farmacêuticos e de enzimas (KAAIJ, 2007), sendo reconhecido como GRAS (generally recognized as safe) pela FDA (Food and Drug Administration) (MHETRAS, BASTAWDE e GOKHALE, 2009), o que lhe garante ser usado para a produção em larga escala nas indústrias de alimentos (BALAJI e EBENEZER, 2008).

Apresentam o talo composto por filamentos tubulares microscópicos chamados hifas, essas são septadas e hialinas, suas cabeças conidiais são inicialmente radiais, mas separam-se em colunas com a maturidade. Os conidiósporos (hifas que contêm esporos) são longos (400-3000 µm) e lisos, tornam-se escuros no ápice e terminam em uma vesícula globosa. Macroscopicamente, se caracterizam no início do crescimento por uma colônia branca, que são células vegetativas, que se tornam marrom escura ou preta após o desenvolvimento dos conídios e o reverso da colônia se caracteriza por uma cor pálida, creme ou amarelada (TRIBST, 2008). Os conídios são esporos assexuados capazes de gerar novos organismos em condições favoráveis. São relativamente grandes, com diâmetro entre 15 a 130 µm. Imagens desse fungo são apresentadas na Figura 4.



**Figura 4** *A. niger*, microscopia eletrônica do aparato reprodutivo assexuado.  
Fonte: SANTOS, 2010.

Estudos sobre as condições para a produção de lipase extracelular por *A. niger* mostraram variações entre as linhagens (MAHADIK et. al., 2002).

As formas mutantes desta espécie também são bastante utilizadas, já que o rendimento do processo enzimático pode ser melhorado através da seleção de mutantes que sejam mais resistentes à repressão catabólica e que sintetizem maiores quantidades de enzima sem a presença de um indutor (MENEZES, 2006).

As linhagens de fungos filamentosos como *A. niger*, estão sendo muito utilizadas em programas de melhoramento para produção de enzimas e outros metabólitos. Alguns programas utilizam a modernidade da engenharia genética, como a síntese de proteína, que permite a transferência controlada de propriedades específicas de uma espécie para outra. No entanto, ainda são realizados métodos convencionais, tais como: radiação UV e agentes químicos (RADZIO e KÜCK, 1997).

*A. niger* já foi isolado da pimenta do reino e como agentes indutores da mutação foram usados: etilmetanosulfonato e exposição à luz ultravioleta (COURI e FARIAS, 1995).

O extrato enzimático de *A. niger* contém diversas enzimas hidrolíticas. Algumas como a poligalacturonase, celulase e hemicelulose são enzimas que degradam células vegetais e são usadas industrialmente para melhorar a qualidade dos produtos como na clarificação de sucos de frutas e vinhos e na extração de óleos de polpa oleaginosas (COURI et al., 2000).

### 3.7 Processos Fermentativos

Bioprocessos são conjuntos de operações que efetuam o tratamento da matéria-prima e/ou resíduo, o preparo dos meios, a esterilização e a transformação do substrato em produto(s) por rota bioquímica, seguida de processos de separação e purificação. São conduzidos mediante ação de agentes biológicos, sendo, portanto, as transformações catalisadas enzimaticamente. Os bioprocessos podem ser divididos em três estágios. A etapa que antecede a transformação, denominada de *upstream*, seguida da etapa de transformação propriamente dita e, finalmente, a etapa de *downstream* (NEI, BON e FERRARA, 2008).

Os processos industriais de produção de enzimas são desenvolvidos, em maior parte, em cultivos submersos aerados. O cultivo no estado sólido é também utilizado, principalmente nos países orientais (BON, FERRARA e CORVO, 2008). A fermentação



submersa ou líquida (FS) e FES foram relatadas como métodos para a produção biotecnológica de lipases (ALBERTON, 2009).

Na FS os micro-organismos são suspensos (submersos) em meio líquido de cultivo contendo, geralmente, os nutrientes dissolvidos (SCHMIDELL et al., 2001) e sob agitação (BON, FERRARA e CORVO, 2008). É amplamente utilizada na indústria de enzimas, e tem vantagens como o controle de processo (temperatura e pH) (COLLA et al., 2010), a mistura entre os componentes do processo (micro-organismos, nutrientes e metabólitos) é homogênea e uniformemente distribuída em todo o fermentador, facilitando a difusão de nutrientes e troca de gases e portanto o crescimento microbiano (GRAMINHA et al., 2008); bons rendimentos com enzimas extracelulares (COLLA et al., 2010); maior eficiência de absorção de nutrientes e excreção de metabólitos pela célula, levando a menores tempos de processo e conseqüentemente, há ganhos em produtividade (BON, FERRARA e CORVO, 2008). É um bioprocesso utilizado em todo o mundo, e cada vez mais informações sobre os processos de engenharia e controles estão disponíveis. Como desvantagens, apresenta menor transferência de oxigênio em meio líquido (COLLA et al., 2010), ocasionando alto custo com aeração e agitação, principalmente em meios com alta viscosidade, e também pode ocorrer a formação de espumas (BON, FERRARA e CORVO, 2008) e como os produtos são relativamente diluídos, o processo de *downstream* lança grandes volumes de efluentes (BALAJI e EBENEZER, 2008).

Na FES, os micro-organismos crescem na superfície das partículas de sólidos úmidos (PANDEY, 2003). Esse processo apresenta condições similares às condições de vida de muitos fungos filamentosos (HÖLKER e LENZ, 2005).

Historicamente, é creditado à FES o início do uso de fermentação para a produção de metabólitos. A partir dos anos 70, devido à publicação de trabalhos referentes à produção de micotoxinas por fungos, as atenções foram voltadas para FES, porém, a grande explosão ocorreu a partir dos anos 90. Já no Brasil, a partir de 1986 iniciou-se uma série de pesquisas referentes à utilização de resíduos agroindustriais como substratos em FES para a produção de metabólitos de alto valor agregado como: etanol, proteínas, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, entre outros (MAZUTTI, 2009).

A FES é caracterizada pelo desenvolvimento de micro-organismos em ambiente com pouca quantidade de água (baixa atividade de água) no espaço entre as partículas de um material não-solúvel, que atua como suporte físico e fonte de nutrientes e carbono para sustentar o crescimento microbiano (VANDENBERGHE et al., 2000). Este material sólido, geralmente é um composto natural que consiste de produtos agrícolas e subprodutos agroindustriais e resíduos, ou material sintético (PANDEY, 2003), nutricionalmente inerte umedecido com uma solução nutritiva (VANDENBERGHE et al., 2000). A capacidade de retenção de líquido varia com o tipo de material (PANDEY, 2003).

A principal razão que a indústria ainda é relutante em usar FES é a falta de conhecimento e de tecnologias de biorreatores em escala industrial. Existem poucos dados sobre a cinética do crescimento do micro-organismo e da formação do produto, de projeto de reatores e há dificuldade de manuseio de sólidos em reatores existentes (WANG e YANG, 2007). Além disso, tem alguns fatores limitantes, tais como a escolha de micro-organismos capazes de crescerem sob condições de umidade reduzida; de seleção, controle e monitoramento de parâmetros de processo como temperatura, pH, umidade e fluxo de ar (MAHADIK et al., 2002); a capacidade para remover o excesso de calor gerado pelo metabolismo de micro-organismos, devido à baixa condutividade térmica (GRAMINHA et al., 2008) e a transferência de calor do meio sólido (COLLA et al., 2010); a transferência de oxigênio que pode ser fator limitante para alguns projetos (DURAND, 2003); e a heterogeneidade do meio em termos de população microbiana e concentração de solutos,

quanto maior a heterogeneidade da mistura, menos precisos são os resultados (GRAMINHA et al., 2008).

A FES tem muitas vantagens para a produção de enzimas frente a FS, tais como, a economia de espaço necessário para fermentação; a simplicidade de meios de fermentação, equipamentos e sistemas de controle; compactação do meio de fermentação no recipiente devido ao menor volume de água; o rendimento superior; baixo consumo de energia, menor capital e custos operacionais (MAHADIK et al., 2002); menor preocupação com produção de resíduos ambientais, pois encontra maiores aplicações para a gestão de resíduos sólidos (VANDENBERGHE et al., 2000); maior produtividade por unidade de volume do reator (SURESH e VIRUTHAGIRI, 2010); quantidade de enzimas segregadas em FES é maior do que em FS (ITO et al., 2011); a esporulação do fungo, é facilitada na FES, haja vista que a cultura de superfície sólida é o ambiente natural dos fungos (ROCHA, 2010); o micro-organismo produz o metabólito de forma concentrada e se as operações de recuperação forem feitas de forma adequada, é possível obter um extrato bruto concentrado, reduzindo, portanto, os custos com o processo de recuperação do metabólito (CASTILHO, ALVES e MEDRONHO, 1999) e a grande variedade de matrizes no processo de fermentação, que variam em termos de composição, tamanho, porosidade, resistência e capacidade de retenção de água, fatores que podem afetar o *design* e o controle de parâmetros (DURAND, 2003).

A produção de enzimas fúngicas em FES proporciona maior produtividade volumétrica quando comparada com a FS, além disso, é menos propenso a problemas com inibição de substrato; e o tempo de fermentação e a degradação das enzimas por proteases indesejáveis são minimizados (HÖLKER e LENZ, 2005).

A disponibilidade de nutrientes é mais limitada em substratos sólidos naturais do que em culturas líquidas, portanto, é provável que os fungos tendam a desenvolver sistemas de enzimas mais eficientes para a degradação de substrato que em culturas líquidas (TENGERDY e SZAKACS, 2003).

Uma análise econômica da produção de lipase por *Penicillium restrictum* sob FES e FS revelou que, para uma escala de produção de 100 m<sup>3</sup>/ano, a FES foi mais econômica do que FS (BALAJI e EBENEZER, 2008). Castilho et al. (2000) comprovaram que o processo de produção de 100 m<sup>3</sup> de lipase por ano custa 78% mais caro quando em FS, tornando o processo de FES economicamente mais atraente.

### 3.8 Biorreatores

Os biorreatores, nos processos fermentativos, devem criar ambiente propício para o crescimento e a atividade dos micro-organismos. Para ser considerado ideal, um biorreator deve ser construído com material atóxico, sendo capaz de suportar altas pressões, para o caso das esterilizações; possuir sistema de agitação e/ou aeração, bem como permitir a retirada periódica de amostras, sem comprometer o processo; possuir mecanismo de resfriamento de forma a controlar a temperatura do ambiente de reação e, por fim, ser capaz de operar em condições assépticas (MENEZES, 2006).

Apesar dos reatores para FS terem sido bem desenvolvidos, eles não poderiam ser aplicados à FES devido às diferenças nas estruturas físicas do sistema (MITCHELL et al., 2000). A escolha do reator adequado pode minimizar, ou até mesmo solucionar, vários problemas relativos à condução da FES (MENEZES, 2006).

Segundo Durand (2003) alguns fatores alteram o *design* do biorreator como: a morfologia do fungo (presença ou não de septo nas hifas) relacionada à sua resistência à agitação mecânica; e a necessidade ou não de ter um processo de esterilização. Vários tipos

de reatores são capazes de executar a fermentação em escala de laboratório com quantidades pequenas de meio, mas o *scale-up* é complicado, principalmente pela geração de calor intenso e heterogeneidade no sistema.

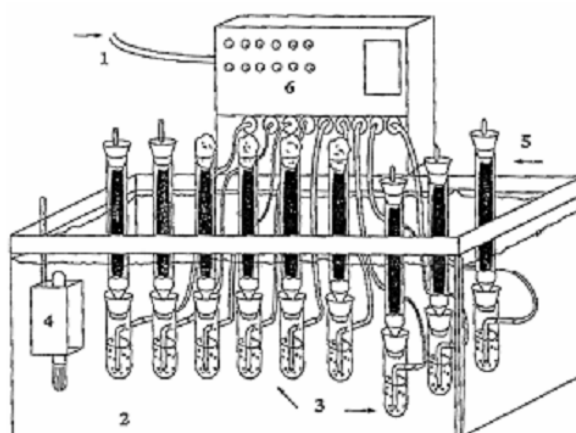
Existe uma grande diversidade de configurações para os reatores em FES, em escala de laboratório (MENEZES, 2006). Os reatores mais comumente utilizados são os reatores de bandeja, de leito fixo ou de coluna e de tambor rotativo, pois eles variam as condições de agitação e aeração (WANG e YANG 2007).

O reator de leito fixo, misturado com aeração forçada tem o potencial para um desempenho melhor que outros biorreatores devido às características de transferência de massa e calor (WANG e YANG, 2007).

### 3.8.1 Biorreatores de coluna

Um dos equipamentos interessantes em escala de laboratório é o equipamento inicialmente desenvolvido e patenteado por uma equipe de ORSTOM entre 1975 e 1980. Ele é composto de pequenas colunas preenchidas com meio previamente inoculado e colocado em banho de água termostaticado e o ar passa por cada coluna. Este equipamento oferece a possibilidade de aerar a cultura. A concepção deste reator, porém, não permite a amostragem durante a fermentação e por isso é necessário sacrificar uma coluna inteira para cada análise durante o processo. Este equipamento tem a vantagem de ser de fácil uso e com aeração forçada (DURAND, 2003).

Os reatores de coluna (ou de leito fixo) são bastante utilizados, em escala laboratorial, nos processos de FES. Sua utilização minimiza os problemas com os gradientes de temperatura, em função da convecção causada pelo ar que entra diretamente no reator e permite que o CO<sub>2</sub> liberado durante as reações metabólicas, seja eliminado e substituído pelo ar utilizado na aeração do sistema. O controle da temperatura é feito pela imersão do reator em banho termostaticado ou utilizando colunas encamisadas com circulação de líquido refrigerante, e por serem sistemas fechados, estão pouco propensos à contaminação por bactérias (MENEZES, 2006). Nesses reatores, mangueiras ligadas a uma bomba de ar são acopladas na parte inferior das colunas para a realização da aeração (Figura 5) e também para controle da temperatura, uma vez que nesse processo fermentativo ocorre a produção de calor. Esse tipo de reator tem como vantagem o espaço reduzido, o fato de que a carga e a descarga do meio no reator são realizadas de forma mais rápida (DUTRA, 2007).



**Figura 5** Reator de colunas de vidro para a fermentação em estado sólido.

Fonte: DUTRA, 2007.

Reatores de leito fixo permitem a transferência de massa por convecção forçada de ar que é bombeado através do leito. Em comparação aos reatores de bandeja, reatores de leito fixo aumentam a produtividade da enzima. No entanto, eles são difíceis de ampliar e com compactação nas colunas, a manipulação contínua torna-se difícil. Eles também são difíceis para operar como reatores contínuos. Mas, apesar desses problemas, esforços têm sido feitos a fim de melhorar o desempenho de leitos fixos e ampliá-los (WANG e YANG, 2007).

### **3.9 Resíduos Agroindustriais**

Os resíduos agrícolas são produzidos em grandes quantidades em muitos países em desenvolvimento, mas a sua principal utilização tem sido limitada como alimentos para animais ou simplesmente como aterros sanitários. No entanto, esses resíduos representam grandes recursos potenciais para uso em processos biotecnológicos, principalmente devido ao seu baixo custo, acessibilidade e composições de nutrientes como carbono, nitrogênio e minerais. É de interesse econômico para países com abundante biomassa e resíduos agroindustriais (SALIHU et al., 2012), pois se for empregada tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários (PELIZER, PONTIERI e MORAES, 2007).

A FES se apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados, bem como, agregar valor a essas matérias-primas, por meio da produção de substâncias de interesse econômico, como enzimas (PINTO et al., 2005).

Neste sistema, é possível o uso abundante de biomateriais com custos mais baixos (amido, celulose, lignina, hemicelulose, quitina, etc.) com mínimo ou nenhum tratamento prévio, sendo utilizados como substratos (WANG e YANG, 2007) ou como meios de cultura (GUTARRA et al., 2009). São resíduos como torta de óleo (KAMINI, MALA e PUVANAKRISHNAN, 1998), farelo de trigo (MAHADIK et al., 2002), casca de arroz (COLLA et al., 2010), bagaço de cana de açúcar (DIAZ et al., 2006) e resíduos provenientes da produção de óleos vegetais (BALAJI e EBENEZER, 2008).

#### **3.9.1 Resíduos lignocelulósicos**

Os resíduos lignocelulósicos são os mais abundantes no mundo e tal biomassa apresenta um potencial enorme para a obtenção de produtos de interesse industrial como glicose, bioetanol e biomassa proteica (AGUIAR, 2010).

A biomassa lignocelulósica é constituída tipicamente por três principais frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina, que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos (JEFFRIES, 1990). Essas frações majoritárias de hidratos de carbono são responsáveis por 97-99% de toda massa seca dos materiais (SANTOS, 2010).

Os materiais lignocelulósicos incluem vários resíduos agrícolas (palhas, cascas e farelos) (AGUIAR, 2010). Nos últimos anos especial atenção vem sendo dada a alternativas que conduzam à minimização ou ao reaproveitamento dos resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais com elevada carga orgânica, e que podem acarretar graves consequências ambientais (MENEZES et al., 2006). Esses resíduos podem ser utilizados como substratos sólidos e como suporte para crescimento do micro-organismo. Na Tabela 4 tem-se alguns resíduos agrícolas empregados na FES e a principal fonte de nutriente sem pré-tratamento (EL-BENDARY, 2010).

**Tabela 4** Composição dos resíduos agrícolas.

Resíduos Agrícolas	Total de proteína (%)	Total de carboidrato (%)
Farelo de trigo	16,08	78,00
Casca de arroz	2,48	74,18
Palha de trigo	2,24	86,96
Palha de milho	4,44	85,43
Espiga de milho	6,38	85,01
Casca de batata	13,11	69,81

Fonte: EL-BENDARY, 2010.

Uma série de substratos podem ser utilizados para cultivo de micro-organismo em FES na produção de diversas enzimas, o farelo de trigo é comumente o mais utilizado para esse processo (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000), porque apresenta nutrientes suficientes e tem capacidade de permanecer solto, mesmo em condições úmidas, proporcionando assim uma grande área superficial (MAHADIK et al., 2002)

### 3.9.2 Borra alcalina de óleo

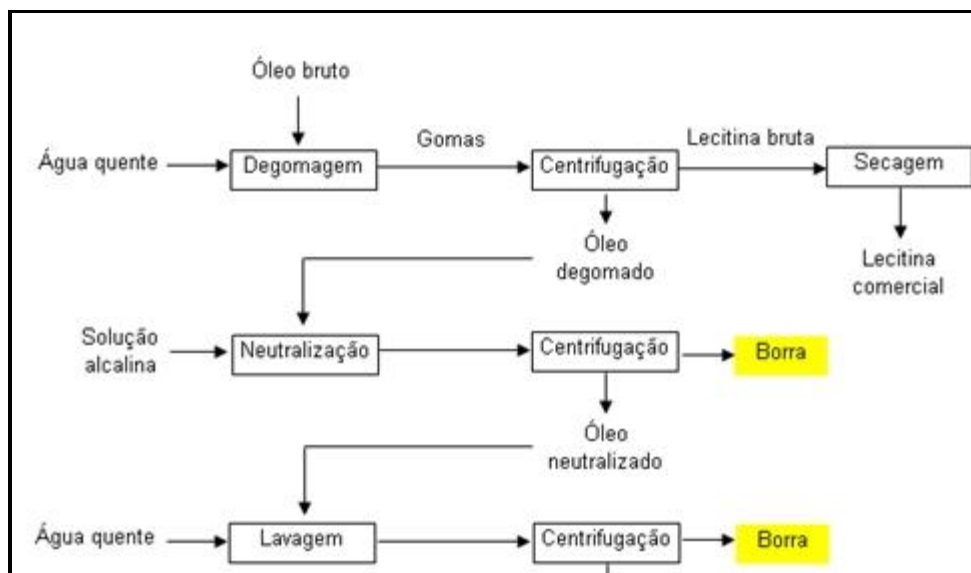
Resíduos obtidos a partir da extração de óleos têm sido utilizados para produção fermentativa de lipases, isto porque, seu conteúdo de óleo residual serve como indutor para a produção de lipase (SALIHU, et al., 2012). A borra representa geralmente de 5 a 10% da massa de óleo bruto e maiores valores são obtidos se o óleo possuir alta concentração de ácidos graxos livres (DOWD, 1996).

A borra é o principal subproduto da indústria de refino de óleos vegetais. Os sabões de sódio são formados durante o primeiro refino do óleo bruto através da reação de neutralização para extração dos ácidos graxos livres com hidróxido de sódio. Esses sabões e a maioria dos materiais não oleosos são separados do óleo por centrifugação e denominados de borra alcalina (DOWD, 1998).

A borra é constituída por sais de sódio, de ácidos graxos e outras substâncias como água, triacilgliceróis, fosfolipídeos, matéria insaponificável, produtos de degradação e outros materiais não oleosos incorporados ao sabão (FRÉ, 2009) como proteínas e carboidratos (JOHANSEN et al., 1996). É um material complexo e heterogêneo, difícil de manusear e analisar. À temperatura ambiente apresenta uma consistência que varia de aquoso ou oleoso para pastoso ou firme. Quando exposta ao ar, a borra perde umidade rapidamente e pode ser instável a temperaturas elevadas devido a presença de resíduos alcalinos, portanto deve ser armazenada congelada para limitar as alterações (DOWD, 1998).

As borras neutralizadas podem ser empregadas diretamente na fabricação de sabões (FRÉ, 2009) ou destinadas para outros fins como fonte de nutrientes para os micro-organismos (DAMASO et al., 2008).

As borras alcalinas, oriundas do refino de óleos (Figura 6), podem ser utilizadas como indutores para produção de metabólitos. A viabilidade técnica da utilização de produtos de refino de óleo, em meios de fermentação como indutores para produção de lipase já foi reportado na literatura (DAMASO et al., 2008). O óleo neutro (ou acilgliceróis) nessa borra alcalina está disponível para o crescimento do fungo e produção de lipase.



**Figura 6** Fluxograma para obtenção da borra de óleo.  
Fonte: FRÉ, 2009.

### 3.10 Fatores que Influenciam a Produção de Lipase

Para produção de enzimas é necessária: a seleção da matéria-prima, a preparação de inóculo específico, a fermentação propriamente dita e o controle da mesma, bem como a extração e a purificação (se necessária) dos produtos que se deseja (SANTOS, 2010).

A composição do meio de cultivo deve fornecer nutrientes necessários ao crescimento do micro-organismo, bem como para produção de compostos metabólitos adequados para suprir a energia para biossíntese e manutenção celular. Estes compostos incluem carbono e nitrogênio (orgânico e inorgânico), sais, vitaminas e indutores de produção de lipase, pois a presença de substratos lipídicos pode induzir a produção dessa enzima (CASTIGLIONI, 2009).

As lipases extracelulares são secretadas em quantidades significativas por algumas espécies de fungos filamentosos, quando estes são cultivados em condições apropriadas, sendo facilmente separadas da massa micelial por filtração ou centrifugação (COLEN, 2006). Como estas são excretadas através da membrana externa para o meio de cultura (CASTIGLIONI, 2009), garantem fácil e simplificada recuperação do produto (SILVA, CONTESINI e CARVALHO, 2008).

A síntese das lipases pode ocorrer devido à necessidade dos micro-organismos de metabolizar compostos que são insolúveis em água (DESAI e BANAT, 1997).

As características bioquímicas das lipases microbianas dependem da fonte de obtenção da enzima (Tabela 5) (ALBERTON, 2009). A temperatura e o teor de água durante a FES são muito importantes para o crescimento de fungos, bem como para a produção de enzimas e metabólitos secundários (ITO et al., 2011).

Dentre as variáveis do processo fermentativo, o binômio temperatura e pH tem sido amplamente estudado e considerado fator de grande influência na atividade das enzimas produzidas (CARVALHO et al., 2005). Cada micro-organismo apresenta um valor de pH ótimo para o crescimento e muitas vezes pode variar para a produção de lipase. Durante a fermentação podem ocorrer variações no pH do meio, ocasionado pelo desenvolvimento do micro-organismo, composição do meio e pelos demais parâmetros do processo de fermentação (CASTIGLIONI, 2009).

**Tabela 5** Características bioquímicas de lipases microbianas.

Micro-organismo	pH*	pH estabilidade	Temperatura (°C)*	Temperatura estabilidade (°C)
	8,5	-	30	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	7,5	4,5-7,5	35	45
	8,0	5,0 -8,0	37	-
<i>Rhizopus homothallicus</i>	7,5	-	40	50
<i>Rhizopus chinensis</i>	8,0-8,5	5,5-7,0	40	30-35
<i>Aspergillus niger</i>	7	<b>4,0-10</b>	<b>37</b>	<b>4,0-50</b>
<i>Penicillium cyclopium</i>	7,0	4,5-7,0	40	25-40
<i>Bacillus</i> SP	8,7	-	-	70-85
	9,5	-	60	75
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	9,0-10	5,0-11	60-65	30-60
	7,5	-	70-75	60-70
<i>Bacillus</i> sp Rs-12	8	-	50-55	65-75
Gênero <i>Pseudomonas</i>	5,5-9,5	2,0-12	22-80	35-70

(\*) melhores valores de pH e temperatura para ação de lipase de diferentes micro-organismos.

(-) Não especificado no trabalho.

Fonte: ALBERTON, 2009.

### 3.10.1 Substrato e fonte de carbono

Em FES o tipo de substrato pode ser usado para melhorar a produção de enzimas (COUTO e SANROMÁN, 2006). A seleção desse substrato depende da sua composição química (ALBERTON, 2009) e de fatores relacionados ao custo e a disponibilidade. O ideal é aquele que fornece todos os nutrientes necessários para os micro-organismos crescerem, entretanto, alguns nutrientes podem estar em baixa concentração ou mesmo não estarem presentes no substrato, sendo necessário acrescentá-lo (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000).

Os substratos utilizados na FES podem servir como suporte e como fonte de nutrientes (rejeitos industriais) ou apenas suportes inertes (por exemplo, espuma de poliuretano) suplementados com meio contendo nutrientes (ALBERTON, 2009). São, em geral, resíduos ou subprodutos da agroindústria, e têm como principais componentes: celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, o que os caracteriza como materiais extremamente heterogêneos e que atuam tanto como fonte de carbono quanto de energia (PANDEY, 2003).

A composição dos diferentes substratos interfere na atividade enzimática, uma vez que a hemicelulose e a lignina conferem uma limitação para a assimilação da fonte de carbono pelo micro-organismo agente da fermentação (FARINAS et al., 2008).

O carbono é um elemento necessário para a biossíntese de diversos constituintes celulares, como carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos. A maioria dos micro-organismos satisfaz a maior parte de suas necessidades de carbono pela incorporação de metabólitos obtidos pela degradação de substratos orgânicos (NEI, BON e FERRARA, 2008).

A produção de lipase é necessariamente afetada pela fonte de carbono no meio de cultura. Como substrato para produção de lipase e crescimento microbiano, as fontes desse elemento mais usuais são: os carboidratos, os ácidos orgânicos, os gliceróis, outros alcoóis e ácidos graxos (GONÇALVES, 2007).

Farinas et al. (2008) utilizaram resíduos agroindustriais como substrato e fonte de carbono para a produção de celulases, e avaliaram a viabilidade de quatro diferentes resíduos (farelo de soja, bagaço de cana, bagaço de laranja e casca de arroz) produzidos em abundância no Brasil, utilizando como agente da fermentação o fungo filamentosso *A. niger*. A comparação dos substratos foi realizada em termos das atividades enzimáticas após 72 h de fermentação e obtiveram a melhor produtividade quando utilizaram o substrato farelo de soja. Todos os materiais lignocelulósicos avaliados foram utilizados sem qualquer tipo de pré-tratamento para reduzir sua recalcitrância. Desta forma, a inclusão de uma etapa de pré-tratamento também poderia contribuir para aumentar a produtividade enzimática nos substratos.

Rodriguez et al. (2006) prepararam um meio com óleo de oliva (40 g/L) e ureia e avaliaram o efeito de diferentes tipos de carbono na produção de lipase por *Rhizopus homothallicus* em FES. Eles concluíram que o tipo de carboidrato não influenciou a produção de lipase, provavelmente porque a concentração de carboidratos foi baixa (5 g/L) em comparação com a quantidade de óleo adicionado ao meio de cultura e porque eles são, provavelmente, utilizados antes do óleo e conseqüentemente, antes da produção de lipase.

### 3.10.2 Fonte de nitrogênio

Geralmente, a elevada concentração de fontes de nitrogênio no meio de fermentação é eficaz para aumentar a produção de lipases por micro-organismos (SUN e XU, 2008). As enzimas são constituídas de aminoácidos que apresentam nitrogênio na sua estrutura e, portanto é um nutriente essencial para produção de enzimas (ROVEDA, HEMKEMEIER e COLLA, 2010), bem como para formação estrutural dos fungos, podendo atingir até 15% em massa seca (NEI, BON e FERRARA, 2008).

A fonte de nitrogênio é fator que tem mostrado grande influência sobre a produção de enzimas lipolíticas. Tanto o nitrogênio orgânico (TAN et al., 2003) (na forma de ureia, aminoácidos ou extratos de levedura), quanto o inorgânico (na forma de sais de nitritos, nitratos ou amônio) (SLIVINSKI, 2007) apresentam importante papel na síntese da enzima (TAN et al., 2003).

As fontes de nitrogênio comuns usadas para produção de lipase, têm sido: água de maceração de milho, farinha de soja e hidrolisados enzimáticos de proteínas (peptonas), uréia, nitrato, sais de amônio (MONTESINOS et al., 1996) e hidrolisados ácidos de proteínas (GONÇALVES, 2007). A seleção da fonte de nitrogênio mais adequada depende do micro-organismo usado (MONTESINOS et al., 1996) e da associação com outros ingredientes do meio de cultura (GONÇALVES, 2007).

Selvakumar, Ashakumary e Pandey (1998) utilizaram FES com inóculo de *Aspergillus niger* NCIM 1245, e resíduos de chá para produção de glucoamilase. As fontes orgânicas de suplemento de nitrogênio foram adicionadas ao meio em concentração de 1% (m/m). Entre as distintas fontes testadas, o extrato de malte com 226 U/g<sub>ms</sub> (grama de massa seca) foi a que melhor produziu efeito positivo na atividade enzimática, seguida pelo ácido casamino (218,5 U/g<sub>ms</sub>) e da peptona (216,7 U/g<sub>ms</sub>), em comparação com o controle (195,2 U/g<sub>ms</sub>) após 72 h de cultivo.

No trabalho realizado por Sun e Xu (2008), no qual se produziu lipase por FES utilizando *Rhizopus chinensis*, das fontes de nitrogênio inorgânico testadas, apenas



hidrogenofosfato de amônio teve efeito positivo sobre a enzima. Enquanto, entre as fontes de nitrogênio orgânico testadas, todas promoveram o aumento da produção de enzimas, com exceção da ureia. A suplementação de 2% (m/m) de peptona proporcionou a maior atividade, dentre as fontes testadas.

Jayprakash e Ebenezer (2010) estudaram a influência de fontes de nitrogênio, na concentração de 1,0%, para produção de lipase extracelular por *A. japonicus*. Os autores testaram fontes de nitrogênio orgânico como peptona, extrato de levedura e fontes de nitrogênio inorgânico como cloreto de amônio, sulfato de amônio, nitrato de amônio e ureia e concluíram que a peptona favoreceu a atividade máxima da lipase.

Segundo Kumar et al. (2011a), entre as fontes de nitrogênio orgânico, o extrato de levedura revelou-se como substrato adequado para produção de lipase.

### 3.10.3 Indutores para produção de lipase

A maioria das lipases tem sido detectada em meios de cultura que contenham fontes lipídicas, o que sugere que, normalmente, a enzima é produzida por indução (SHIRAZI, RAHMAN e RAHMAN, 1998). Diferentes fontes lipídicas podem ser usadas para síntese da lipase como o óleo de oliva (DUTRA et al., 2008), óleo de soja (TAN et al., 2003), tween 80 (KUMAR et al., 2011a), ácido oléico e triburina (SHIRAZI, RAHMAN e RAHMAN, 1998).

Montesinos et al. (1996) explicaram que substratos insolúveis como os citados acima, facilitam a associação das lipases e permitem o rápido crescimento celular em presença de ácido graxo.

Obradors et al. (1993) testaram vários ácidos graxos para produção de lipase por *Candida rugosa* e o ácido oléico resultante da hidrólise do óleo de oliva foi indicado como o melhor para cultivar o micro-organismo e induzir a produção da enzima, com atividade de 1,42 U/mL.h, em comparação com o ácido caprílico (0,317 U/mL.h) e cáprico (0,375 U/mL.h). Esses últimos estão relacionados a problemas de toxicidade.

Em fungos, embora substratos lipídicos e ácidos graxos geralmente atuem como indutores, em muitas espécies, tais como *Aspergillus* (POKORNY, FRIEDRICH e CIMERMAN, 1994), sendo fontes geralmente essenciais para obtenção de alto rendimento da enzima lipase, bons rendimentos são conseguidos em ausência de óleos e gorduras (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

### 3.10.4 Inóculo

Entre os fatores que determinam o desenvolvimento do fungo e a produção do composto de interesse, a quantidade, o tipo (esporo ou vegetativo), tamanho e a idade do inóculo são de suma importância (PAPAGIANNI e MOO-YOUNG, 2002).

A estratégia de inoculação é uma questão importante na FES, pois quando em grande escala, o tipo de inóculo e a concentração podem tornar-se um aspecto de grande relevância, devido às dificuldades encontradas na geração de grandes quantidades de esporos fúngicos, que representam geralmente o tipo de inóculo empregado na FES (GUTARRA et al., 2005).

Kamini, Mala e Puvanakrishnan (1998) estudaram a produção de lipase por *Aspergillus niger* em FES com torta de óleo de gergelim como meio de cultura. As melhores atividades foram obtidas com 72 h de fermentação. A concentração de esporos de  $1,07 \times 10^8$  esporos/g<sub>m</sub> (grama de meio) foi indicada como ideal para produção de lipase (358,8 U/g<sub>ms</sub>), sem aumento significativo na atividade da enzima em concentração de

esporos maior. A partir de  $4,30 \times 10^8$  esporos/g<sub>m</sub> começou a ocorrer um decréscimo na atividade (355,9 U/g<sub>ms</sub>).

Gutarra et al. (2005) estudaram a influência do inóculo na produção de lipase por FES, em torta de babaçu, usando *Penicillium simplicissimum*, como agente de fermentação. No entanto, a cinética de produção de lipase foi semelhante apesar de diferentes concentrações ( $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  esporos/g de torta) de suspensões de esporos terem sido utilizadas como inóculo. O valor máximo da atividade da lipase foi obtido após 48 h para  $10^7$  e  $10^8$  esporos/g<sub>m</sub> (20,2 e 21,1 U/g, respectivamente) e após 72 h para  $10^6$  esporos/g<sub>m</sub> (16,4 U/g). Com base nesses dados, pode-se concluir que as concentrações de esporos superiores a  $10^7$  esporos/g<sub>m</sub> não afetaram significativamente a produção de lipase.

### 3.10.5 Atividade de água e umidade

A água apresenta papel primordial em bioprocessos, pois é responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular (DUTRA, 2007).

Entre as características da FES, a baixa atividade de água (Aa), em meio sólido influencia aspectos fisiológicos do micro-organismo, tais como o crescimento vegetativo, esporulação e germinação de esporos, bem como a produção de metabólitos e de enzimas e a atividade enzimática (GRAMINHA et al., 2008). Uma vez que se a quantidade de água não for suficiente para manter as propriedades funcionais de algumas enzimas, a perda da atividade enzimática pode levar ao desequilíbrio na cadeia metabólica das células. O substrato/suporte utilizado na FES deve possuir umidade suficiente para o crescimento e metabolismo microbiano (DUTRA, 2007).

Baixos níveis de Aa significam baixa disponibilidade de moléculas de água nas proximidades das células, dificultando a troca de solutos na fase sólida e, com isso, diminuindo o metabolismo acarretando menores taxas de crescimento ou de síntese de metabólitos. Em contrapartida, elevados níveis de Aa dificultam a difusão de ar pelas partículas sólidas; quando a linhagem é aeróbica, esse efeito também leva à redução no crescimento (PINTO et al., 2005).

No trabalho de Pinto et al. (2005), utilizando a linhagem de *A. niger* em meio com casca de maracujá triturada, foi adicionado diferentes volume de água (mL) em 100 g de meio objetivando analisar o crescimento do fungo em relação à umidade e a Aa obtida. Foi observado que os maiores níveis de crescimento do fungo foram obtidos quando a Aa inicial foi entre 0,96 e 0,97 com umidade de 53,5% (100 mL de água) e 62,8% (150 mL de água), respectivamente. Valores de Aa iniciais muito baixos (0,911) e umidade de 38,0% (50 mL de água), ou muito elevados (0,985) com alta umidade 73,4% (250 mL), foram desfavoráveis ao crescimento. Esse resultado também foi encontrado quando se utilizou como resíduo, a película de amêndoa de caju.

Dutra (2007) estudou o efeito da umidade no processo de FES para produção de lipase utilizando *A. niger*, em substrato farelo de trigo e como indutor o óleo de mamona. Três condições de umidade (50, 60 e 70%) ajustadas através da adição da solução de sulfato de amônio 0,91% (m/v) ao meio fermentativo foram estudadas. Os resultados mostraram que o melhor teor de umidade para a produção de lipase foi de 60%.

O aumento no teor de umidade causa decréscimo na porosidade do substrato, diminuindo a troca gasosa. Um baixo teor de umidade acarreta menor crescimento do micro-organismo e menor grau de inchamento do substrato, o que também diminui a produção de enzima (MAHANTA, GUPTA e KHARE, 2008).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

As análises das borras e o processo de fermentação para produção da lipase, foram realizados na Embrapa Agroindústria de Alimentos, localizada em Pedra de Guaratiba, Rio de Janeiro/RJ, nos laboratórios de óleos graxos, de minerais e de processos fermentativos.

### 4.1 Caracterização dos Indutores

As borras alcalinas oriundas dos refinados dos óleos de canola, milho e girassol que foram utilizadas como indutores na etapa de fermentação em estado sólido foram gentilmente cedidas pelas Indústrias Granfino S/A, situada em Nova Iguaçu-RJ.

#### 4.1.1 Análises realizadas nas borras alcalinas de óleo de canola, milho e girassol

- **Determinação de óleo neutro**

A análise de óleo neutro foi determinada segundo a metodologia oficial AOCS G5-40, com modificações (AOCS, 2009). A borra de óleo foi homogeneizada com 60 mL de solução 50% de etanol e 25 mL de éter de petróleo em agitador com barra magnética. Em seguida, foram adicionados 60 mL de água destilada e, posteriormente, 50 mL de éter etílico. Após ocorrer a separação de fases, a fase superior (éter de petróleo e óleo) foi mantida e a fase inferior (aquosa) foi transferida para outro funil de separação.

Seguiram-se mais duas extrações do óleo com 50 mL de éter de petróleo. As fases superiores foram acondicionadas em um mesmo funil e lavadas com 50 mL de água destilada até obtenção do pH neutro. Em seguida, foi feita a filtração com papel de filtro e sulfato de sódio anidro. O filtrado foi recolhido em balão de fundo chato previamente pesado. O balão foi levado ao rotaevaporador a 25°C até evaporar todo o solvente. Um mililitro de acetona foi adicionado ao óleo no balão e a secagem foi feita com nitrogênio. Em seguida, o balão contendo somente óleo foi pesado. O cálculo para determinação do óleo neutro foi realizado segundo a Equação 1.

$$\text{Óleo neutro (\%)} = \frac{\text{massa do óleo (g)} \times 100}{\text{massa da amostra (g)}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

massa do óleo = valor obtido pela diferença da massa do balão após etapa de secagem com nitrogênio e a massa do balão vazio

massa da amostra = massa inicial da borra

- **Determinação do pH**

Este método determinou a alcalinidade das borras através da medida do pH da fase aquosa extraída seguindo a metodologia oficial AOCS G7-56, com modificações (AOCS, 2009).

Aproximadamente 20 g de borra foi pesada e homogeneizada com 20 mL de água destilada, em seguida mediu-se o pH utilizando-se potenciômetro modelo 827 com eletrodo Primatrode e solução tampão Certipur Merck de pH 4,00 e 7,00, como padrões.

- **Determinação do teor de resíduos de sabão**

A análise do teor de resíduo de sabão foi determinada segundo a metodologia oficial AOCS Cc 17 95 com modificações (AOCS, 2009), na qual, 0,4 g de borra foi homogeneizada com 30 mL de água destilada e 70 mL de solução de acetona (97 mL de acetona + 1 mL de azul de bromofenol + 2 mL de água). A amostra foi titulada com HCl 0,1 N, previamente padronizado, até viragem de azul para amarelo. O cálculo foi realizado segundo a Equação 2.

$$\text{Sabão (ppm)} = \frac{V * N * 304 * 1000}{m} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

V= volume (mL) de ácido titulado

N= normalidade do HCl 0,1 N

304= peso molecular do ácido oléico (282) mais 22, porque o teor de sabão refere-se a outros ácidos graxos além do ácido oléico.

m= massa da amostra (g)

- **Umidade**

A análise de umidade foi realizada segundo o método de Karl Fisher, utilizando o aparelho Karl Fisher 870 Titrino plus da Metrohm. Aproximadamente 0,1 g de amostra foi dissolvida em solvente. Para a borra de girassol e canola foram usados 25 mL de clorofórmio, já a borra de milho foi dissolvida com 30 mL da solução metanol mais clorofórmio, na proporção 2:1.

- **Perfil em ácidos graxos por cromatografia gasosa**

Para análise da composição em ácidos graxos, os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foram preparados de acordo com o método Hartman e Lago (1973) e analisado por cromatografia em fase gasosa em equipamento Agilent Technologies modelo 6890 N, equipado com detector de ionização por chama, operado a 280°C. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida de filme de cianopropilsiloxano. Realizou-se a identificação por comparação dos tempos de retenção com os padrões da NU-CHEK PREP, Inc (Elysian, MN) e a quantificação foi realizada por normalização interna da Embrapa.

- **Teor de Cinzas**

A metodologia empregada na determinação do percentual de cinzas na borra baseia-se no método AOCS 923-03 da AOCS (2005). Este método determina o resíduo remanescente após a queima da amostra sob as condições específicas do teste.

- **Minerais**

A metodologia empregada na determinação de minerais na borra baseou-se no método AOCS 999-10 e 900-08 da AOCS (2005). Foram quantificados os seguintes minerais: sódio, cálcio, potássio, fósforo, ferro e cobre.

## 4.2 Produção da Enzima

### 4.2.1 Agente da fermentação

O micro-organismo utilizado como agente de fermentação foi o fungo filamentoso *Aspergillus niger* 11T53A14 pertencente à Coleção de Culturas da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Esta linhagem foi obtida por processo de indução de mutação por tratamento químico com etilmetanossulfonato seguido de radiação ultravioleta a partir de uma linhagem selvagem isolada da pimenta-do-reino (COURI e FARIAS, 1995).

A linhagem foi selecionada por Damaso et al. (2008) com base na boa capacidade produtora de lipase.

### 4.2.2 Meio de manutenção e ativação

A linhagem fúngica foi mantida e ativada em meio básico (COURI e FARIAS, 1995), em gelose inclinada, tendo como fonte de carbono o óleo de oliva. Na Tabela 6 estão apresentados os ingredientes que compõem esse meio.

**Tabela 6** Composição do meio de manutenção e ativação do micro-organismo.

Componentes	Concentração
Nitrato de sódio (NaNO <sub>3</sub> )	3,00 (g/L)
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> )	0,5 (g/L)
Cloreto de potássio (KCl)	0,5 (g/L)
Sulfato ferroso (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,01 (g/L)
Fosfato dibásico de potássio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,0 (g/L)
Agar-ágar	30,0 (g/L)
Óleo de oliva	20,0 (mL/L)

Fonte: COURI e FARIAS, 1995.

### 4.2.3 Produção de conídios para fermentação

Vinte mililitros de solução 0,1% de Tween 80 (agente tensoativo) foram adicionados sobre os conídios da gelose inclinada com o objetivo de que eles fossem liberados da superfície da gelose formando uma suspensão. Um e meio mililitros da suspensão foram transferidos para o meio de sabugo de milho (ANEXO A) que foi o meio utilizado para produção de conídios (COURI e FARIAS, 1995). Esse meio é apropriado para crescimento de conídios de fungos filamentosos, porque o fungo cresce em superfície maior e em meio mais rico pela composição do próprio material, mas também pela adição de nutrientes, o que conseqüentemente aumenta a esporulação.

Os frascos contendo o meio de sabugo inoculado com a suspensão de conídios foram incubados em câmara de incubação (BOD) por 5 dias na temperatura de 32°C e mantidos por até dois meses a 4°C.

Para a obtenção do sabugo de milho moído, espigas de milho foram obtidas no mercado local mais próximo, cozidas e retiradas os gomos. O sabugo foi seco em estufa e moído em moinho de facas a fim de atingir uma granulometria de 3-4 mm.

#### 4.2.4 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo foram adicionados 20 mL de uma solução 0,1% de Tween 80 por frasco de sabugo de milho contendo os conídios. O líquido contendo os esporos foi filtrado com gaze para obtenção de uma suspensão de conídios, cuja concentração de esporos foi determinada através de contagem na Câmara de Neubauer (ANEXO B).

#### 4.2.5 Meio para fermentação em estado sólido

O meio para fermentação foi composto por 100 g de farelo de trigo triturado, umidificado com solução contendo fonte de nitrogênio, solução de sulfato de amônio (p/v) pH 7,0 e presença ou não de indutores (borra alcalina) em concentrações propostas nos planejamentos experimentais (item 4.3). O farelo foi fornecido pela indústria Bunge Alimentos S/A situada no Rio de Janeiro-RJ.

Geralmente, o farelo de trigo apresenta em sua composição: 2,8% lipídeos, 56,7% de carboidratos, 14,5% de proteína e 33% de fibra (FERNANDES, 2007).

Após preparo do meio (ANEXO C), 40 g do mesmo foi colocado em frasco erlenmeyer para esterilização em autoclave a 121°C a 1 atm por 15 min.

Os diferentes volumes de solução de sulfato de amônio foram adicionados ao meio de cultura de modo que o meio atingisse diferentes umidades.

#### 4.2.6 Produção de lipase por fermentação em estado sólido

Os experimentos de produção da enzima foram conduzidos em colunas aeradas, sendo estas incubadas em banho-maria a 32°C com entrada controlada de ar seco de 1,0 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto).

A vazão de ar foi selecionada de trabalhos anteriores como melhor aeração para a produção de lipase por *A. niger* em FES (MACEDO et al., 2009). O tempo de duração do experimento foi de 72 h, baseado no experimento de Damaso et al. (2008), que obteve bons resultados após 48 h em FES utilizando a mesma espécie fúngica mutante.

As variáveis de processo a serem estudadas para a produção de lipase foram: concentração de nitrogênio (%) (ANEXO D), volume de solução de sulfato de amônio (mL), concentração de inóculo (esporos/g<sub>m</sub>) e concentração de indutor (%) (no caso dos experimentos utilizando as borras).

Os experimentos foram desenvolvidos seguindo metodologia de planejamento experimental (item 4.3). Após a fermentação, a enzima foi extraída com a adição de 2,5 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 por grama de meio fermentado, permanecendo por 1 h em *shaker*, sob agitação na temperatura de incubação (32°C). O extrato enzimático foi obtido utilizando-se filtração com papel de filtro seguido de filtração em membrana de microfiltração (0,45 µm) para posterior determinação das atividades enzimáticas, teor de proteína total e atividade proteásica.

### 4.3 Delineamentos Experimentais Usados Durante a Produção de Lipase

Foi adotada a metodologia de planejamento estatístico: primeiro foi utilizado um planejamento fatorial fracionado para selecionar a melhor borra indutora e as variáveis que influenciaram na atividade enzimática. Em seguida, foi utilizado o fatorial completo, com o objetivo de verificar a produção de enzimas e a atuação das variáveis estudadas sem a adição das borras alcalinas.

Por último foi utilizado delineamento central composto rotacional (DCCR) como estratégia para melhorar atividade lipásica, com as variáveis significativas do primeiro delineamento e com a melhor borra indutora.

#### 4.3.1 Experimentos utilizando as borras de canola, girassol e milho

Visando selecionar a melhor borra indutora e identificar como as variáveis de processo: concentração de inóculo, de indutor e de nitrogênio e volume de solução de sulfato de amônio, interfeririam na produção de lipase, foi utilizado delineamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$ , incluindo 3 repetições no ponto central totalizando 11 ensaios. Esse mesmo tratamento foi feito em 3 blocos, diferindo o tipo de indutor (borra de canola, girassol e milho).

Na Tabela 7 têm-se os valores reais utilizados no planejamento fracionado, enquanto na Tabela 8 está apresentada a matriz do delineamento com os valores codificados das variáveis em cada ensaio. Os valores reais para cada variável foram baseados em revisões de literatura e padrões pré-estabelecidos pelo laboratório de Processos Fermentativos da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

**Tabela 7** Valores reais utilizados no delineamento experimental.

Variáveis	-1	0	1
Nitrogênio (%)	0,1	0,3	0,5
VSSA* (mL)	40	60	80
Concentração de inóculo (esporos/g <sub>meio</sub> )	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
Concentração de indutor (%)	1,0	2,0	3,0

\*VSSA= volume de solução de sulfato de amônio.

**Tabela 8** Matriz do delineamento fatorial fracionado (DFF)  $2^{4-1}$  com valores codificados.

Ensaio	Nitrogênio (%)	VSSA* (mL)	Inóculo (esporos/g)	Indutor (%)
1DFF	-1	-1	-1	-1
2DFF	1	-1	-1	1
3DFF	-1	1	-1	1
4DFF	1	1	-1	-1
5DFF	-1	-1	1	1
6DFF	1	-1	1	-1
7DFF	-1	1	1	-1
8DFF	1	1	1	1
9DFF	0	0	0	0
10DFF	0	0	0	0
11DFF	0	0	0	0

\* VSSA= volume de solução de sulfato de amônio.

### 4.3.2 Experimento sem indutor

Visando observar o comportamento do fungo (produção de enzima) sem o uso do indutor, foi utilizado delineamento experimental fatorial completo  $2^3$ , sem pontos axiais com 3 repetições no ponto central totalizando 11 ensaios. Os valores reais do experimento podem ser visualizados na Tabela 9, e na Tabela 10 está a matriz do delineamento com os valores codificados das variáveis em cada ensaio do experimento sem indutor.

**Tabela 9** Valores reais utilizados no delineamento fatorial completo sem indutor.

Variáveis	-1	0	1
Nitrogênio (%)	0,1	0,3	0,5
VSSA* (mL)	40	60	80
Concentração de inóculo (esporos/g <sub>meio</sub> )	$10^6$	$10^7$	$10^8$

VSSA= volume de solução de sulfato de amônio.

**Tabela 10** Matriz do delineamento fatorial completo (DFC)  $2^3$ , sem pontos axiais e sem indutor, com valores codificados.

Ensaio	Nitrogênio (%)	VSSA (mL)	Inóculo (esporos/g <sub>m</sub> )
1DFC	-1	-1	-1
2DFC	1	-1	-1
3DFC	-1	1	-1
4DFC	1	1	-1
5DFC	-1	-1	1
6DFC	1	-1	1
7DFC	-1	1	1
8DFC	1	1	1
9DFC	0	0	0
10DFC	0	0	0
11DFC	0	0	0

VSSA= volume de solução de sulfato de amônio.

### 4.3.3 Experimento de otimização

Objetivando melhorar a atividade da enzima lipase, foi feito outro delineamento experimental utilizando a borra de girassol, que foi a que proporcionou os melhores resultados de atividade no DFF. Para esta finalidade, foi utilizado o delineamento central composto rotacional (DCCR) com 3 repetições no ponto central totalizando 11 ensaios.

Na Tabela 11 estão apresentados os valores reais do DCCR e na Tabela 12 a matriz do delineamento com os valores codificados das variáveis em cada ensaio do experimento.



Foram realizados dois DCCR(s) e em ambos foi utilizado o mesmo planejamento experimental (Tabelas 11 e 12) com alteração somente nas variáveis fixas: quantidade de borra de girassol e de inóculo.

As variáveis, bem como seus valores, foram selecionados com base na análise estatística dos efeitos realizada no experimento de DFF que utilizou a melhor borra indutora (borra de girassol). Essa análise indicou quais variáveis tinham efeito na atividade enzimática e que os valores reais adotados para essas variáveis deveriam ser modificados em um segundo delineamento experimental (DCCR), a fim de aumentar a atividade enzimática.

**Tabela 11** Valores reais utilizados no delineamento experimental com a borra de girassol.

Variáveis	- 1,41	-1	0	1	1,41
Nitrogênio (%)	0,32	0,4	0,6	0,8	0,88
VSSA (mL)	60,9	65	75	85	89,1

\* VSSA= volume de solução de sulfato de amônio.

**Tabela 12** Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup>, para a borra de girassol com valores codificados.

Ensaio	Nitrogênio (%)	VSSA (mL)
1DCCR	-1	-1
2DCCR	1	-1
3DCCR	-1	1
4DCCR	1	1
5DCCR	-1,41	0
6DCCR	1,41	0
7DCCR	0	-1,41
8DCCR	0	1,41
9DCCR	0	0
10DCCR	0	0
11DCCR	0	0

VSSA= volume de solução de sulfato de amônio.

#### 4.4 Determinações Analíticas

##### 4.4.1 Determinação da umidade

A umidade das amostras foi realizada antes da fermentação e com o meio inoculado. A análise foi determinada por gravimetria, através de secagem em estufa à 100°C até atingir peso constante (Equação 3).

$$\text{Umidade \%} = \frac{\text{massa inicial (g)} - \text{massa final (g)}}{\text{massa inicial}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

#### 4.4.2 Proteína extracelular total

O teor de proteína do extrato enzimático foi determinado segundo Lowry et al. (1951). O método colorimétrico baseia-se na produção de compostos de coloração azul formados a partir da reação entre o reagente Folin-Ciucateu e o complexo cobre-proteína originado da reação entre a amostra (contendo proteína) e o cobre presente na solução 1.

Primeiramente, foi preparada a solução 1 a partir de 1 mL de tartarato duplo de sódio e potássio 2% e 1 mL de solução de sulfato de cobre 1%, em balão volumétrico de 100 mL avolumado com solução de carbonato de sódio 2% em NaOH 0,1 M. Um mililitro da enzima diluída (1:5) reagiu por 10 min, no escuro, com 4 mL da solução 1. Em seguida, foi adicionado 0,4 mL do reagente de Folin-Ciucateu. A reação ocorreu por 30 min, também no escuro. Posteriormente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro da marca Biospecto modelo SP-220 a 660 nm. A quantificação foi feita em duplicata. A curva padrão foi construída usando diferentes concentrações de albumina de soro de leite (ANEXO E).

#### 4.4.3 Determinação de atividade lipásica

A atividade lipásica expressa a ação da enzima sobre o óleo presente na emulsão (água-óleo de oliva-goma arábica) e libera ácidos graxos e glicerol. O ácido graxo é titulado com soda, e o volume gasto desse reagente determina a atividade da enzima lipase. Desta forma, a determinação da atividade lipásica no extrato bruto foi conduzida usando método titulométrico e seguindo o procedimento descrito por Pereira et al. (2001), com pequenas modificações.

Adicionou-se 1 mL do extrato enzimático a 4 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,0 e 5 mL de emulsão de goma arábica (48 mL de água destilada, 48 mL de óleo de oliva e 7 g de goma arábica). Após 15 min a 35°C, a reação foi interrompida com a adição de 10 mL de uma solução 1:1:1 de acetona/etanol/água e a titulação realizada com NaOH 0,05 N, até pH final 11,0, e o resultado foi expresso em U/mL. O branco da reação foi realizado adicionando-se a enzima no momento da titulação. Com os volumes de NaOH utilizados foram feitos os cálculos de atividade (Equação 4). Uma unidade de atividade lipásica é definida como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de ácidos graxos por minuto, sob as condições de ensaio padrão. Toda a análise foi feita em duplicata.

A atividade lipásica encontrada em U/mL foi transformada em U/grama de massa seca (U/g<sub>ms</sub>). Isso foi possível considerando o valor do percentual de umidade do meio inoculado, de onde é obtido o valor da massa seca.

$$A = \frac{(V_a - V_b) * N * 1000}{V * t} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

A = atividade lipásica (U/mL)

V<sub>a</sub> = média do volume de solução de NaOH 0,05 N, gasto para titular os ácidos graxos da reação enzimática (mL)

V<sub>b</sub> = média do volume de solução de NaOH 0,05 N gasto para titular o branco da amostra (controle)

N = normalidade da solução de NaOH

V = volume do extrato enzimático usado na reação (mL) = 1 mL

t = tempo de reação (minutos) = 15 min.

#### 4.4.4 Atividade lipásica específica aparente

A atividade lipásica específica aparente (U/g de proteína) foi calculada a partir dos resultados encontrados com a dosagem da atividade lipásica, pelo método titulométrico descrito no item 4.4.3 e pela dosagem de proteínas descrita no item 4.4.2. (Equação 5).

$$\text{Atividade específica aparente} = \frac{\text{Atividade enzimática (U/mL)}}{\text{Concentração de proteína (mg/mL)}} \quad (\text{Equação 5})$$

#### 4.4.5 Atividade proteásica

A atividade proteolítica expressa a ação da enzima sobre um substrato protéico. A atividade da protease foi realizada conforme Charney e Tomarelli (1947), que se baseia na formação de derivados corados em meio alcalino, a partir da digestão de uma solução de azocaseína.

A mistura reacional foi constituída por 0,5 mL de solução 0,5% de azocaseína em tampão acetato de sódio 50 mM de pH 5,0, aclimatada por 10 min à temperatura de 37°C e 0,5 mL do extrato enzimático diluído (1:100). Após 40 min de reação, na mesma temperatura, foi adicionado 0,5 mL de solução de ácido tricloroacético a 10%, visando a precipitação do substrato não digerido pelas enzimas proteolíticas. Em seguida, as amostras foram conduzidas à centrifugação a 3000 rpm por 15 min a 10°C. Foram transferidos 1,0 mL do sobrenadante para tubo de ensaio contendo 1,0 mL de KOH 5 N.

Para cada amostra foi feito um branco utilizando-se extrato enzimático inativado em banho-maria a 100°C por 20 min. A atividade enzimática foi expressa pela diferença de absorbância entre os ensaios com preparados enzimáticos e os seus respectivos brancos, medida a 428 nm, em espectrofotômetro da marca Biospecto modelo SP-220. Toda a análise foi feita em duplicata e a atividade proteásica foi expressa em U/g<sub>ms</sub>.

#### 4.5 Análise Estatística

Os planejamentos experimentais foram avaliados com 90% de confiabilidade segundo o programa Statistica 6.0. Para o delineamento fatorial fracionado foi analisado os efeitos das variáveis e no planejamento fatorial completo utilizou-se a análise de variância (ANOVA).

O teste de comparação de médias, Teste de Tukey, foi utilizado para identificar se houve diferença entre duas médias de experimentos distintos, para isso utilizou-se o programa Sisvar, versão 5.3. O teste foi aplicado na comparação das maiores atividades lipásicas do experimento com (DFF) e sem (DFC) o uso do indutor; e na comparação das maiores atividades lipásicas do planejamento fracionado com o primeiro DCCR.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Caracterização das Borrás de Canola, Milho e Girassol

A borra alcalina consiste basicamente de água, sais de sódio de ácidos graxos (sabão) e óleo neutro (triacilglicerol, acilgliceróis e material insaponificável) (FRÉ, 2009). Segundo este mesmo autor, a qualidade e a composição da borra dependem da composição da semente, do processo e das condições do refino, tal como a concentração e o tipo de agente neutralizante. Fundamentado nesses três componentes, foram feitas as análises físico-químicas das borras de canola, milho e girassol, apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13** Resultados das análises físico-químicas realizadas nas borras

Análises	Borra de canola		Borra de milho		Borra de girassol	
	Média	CV(%)	Média	CV(%)	Média	CV(%)
Umidade (%)	41,88±1,36	3,24	52,59±1,77	3,36	29,72±0,94	3,15
Resíduo de sabão*(%)	39,34±1,16	2,95	31,82±0,42	1,33	47,50±1,20	2,52
Óleo neutro (%)	16,98±0,82	4,83	25,09±1,10	4,37	18,11±3,21	17,71
Cinzas (g/100g)	5,37±0,15	2,77	3,56±0,04	1,19	7,15±0,01	0,20
pH	8,22	-	8,80	-	8,60	-

\*Resíduo de sabão foi expresso em oleato de sódio.

Na Tabela 13, a borra de milho (52,59%), seguida pela borra de canola (41,88%) apresentaram os maiores teores de água representada pela análise de umidade. Análise semelhante foi feita por Damaso et al. (2008) que encontraram 34,6% de umidade para a borra de milho, teor bem inferior ao encontrado nesse trabalho para a mesma borra (52,59%). Essa variação pode ser justificada pelas etapas de lavagens, pelas quais as borras passam para eliminar o conteúdo de sabão residual formado no óleo. Esse conteúdo de água pode variar de uma amostra para outra, mas segundo Mag, Green e Kwong (1983), geralmente, as borras são compostas de 70-95% de água e quando expostas ao ar perdem umidade. Fundamentada nessa informação, todas as borras encontradas têm teor de umidade inferior ao mencionado por esses autores.

Dentre os componentes presentes nas borras, 5-30% é material lipídico e desse material, a maior parte (60-70%) está na forma de sabões de sódio de ácidos graxos (MAG, GREEN e KWONG, 1983). Desta maneira, todas as borras apresentadas na Tabela 13 revelaram teor de resíduo de sabão maior que o citado. A borra de girassol apresentou maior teor de resíduo de sabão, quando comparada com as outras borras, seguido da borra de canola e por último a de milho. Resultado próximo foi encontrado por Damaso et al. (2008), 27,10% de resíduo de sabão para borra de milho. Vale ressaltar que quanto mais ácido está o óleo maior a quantidade de solução aquosa alcalina a ser gasta, consequentemente maior o teor de resíduo de sabão. A elevação da acidez na semente é decorrente de algum atrito físico, que permite que as enzimas entrem em contato com o óleo e comecem a agir liberando os ácidos graxos livres do óleo bruto (FRÉ, 2009).

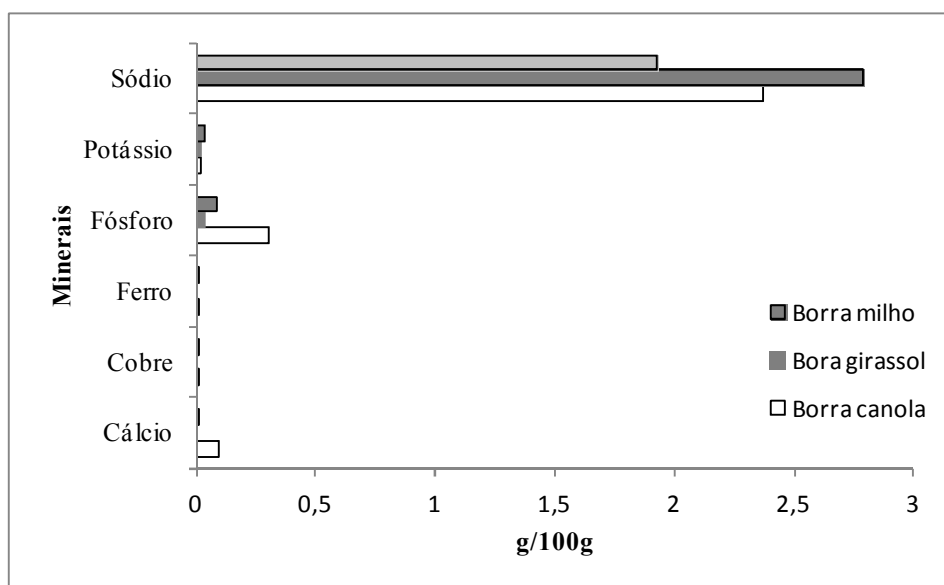
O óleo neutro foi encontrado em maior quantidade na borra de milho (25,09%), seguido da borra de girassol (18,11%) e de canola (16,98%). Semelhante a esse resultado, foi o encontrado por Dowd (1998) quando analisou quimicamente a borra de milho, revelando 23,9% de óleo neutro e o encontrado por Kuk e Ballew (1999), que constataram uma faixa de 11-15 % de óleo neutro na borra de girassol. Porém, Damaso et al. (2008), encontraram valor inferior, 9,93% para a borra de milho, mas mais coerente com a

revelação de Mag, Green e Kwong (1983), que dos 5-10% do material lipídico, 30-40 % é óleo neutro.

Ainda na Tabela 13 pode ser visualizado o teor de cinzas, usado como indicador de minerais presentes nas amostras de borra. Constatou-se que a borra de girassol apresentou alto teor de substâncias inorgânicas (cinzas) na amostra com 7,15%, frente a 5,37% e 3,56% para as borras de canola e milho, respectivamente. Esse fato é explicado pela alta quantidade de resíduo de sabão originado da etapa de neutralização durante o refino do óleo bruto. Damaso et al. (2008) encontraram valor próximo para a borra de milho (4,04%).

Devido a esse processo básico sofrido pelas borras, as mesmas exibem um pH básico (Tabela 13), próximo a 8. Já Johansen et al. (1996) ao avaliar o pH da borra de canola, milho e girassol, encontraram valores de 11,2; 7,2 e 5,6 respectivamente, para neutralização com NaOH 2-5 N. Essas variações entre os resultados são esperadas, não só porque os óleos vêm de diferentes espécies vegetais, mas também porque o processamento técnico varia entre os refinadores.

Segundo a Indústria Granfino S/A que cedeu as borras para o trabalho, as mesmas são neutralizadas com NaOH, essa afirmação pode ser comprovada pelo alto valor do íon sódio nas três amostras como pode se verificado na Figura 7, onde são exibidos os resultados da composição química da amostra de cinzas das borras.



**Figura 7** Resultado das análises de minerais presentes nas borras

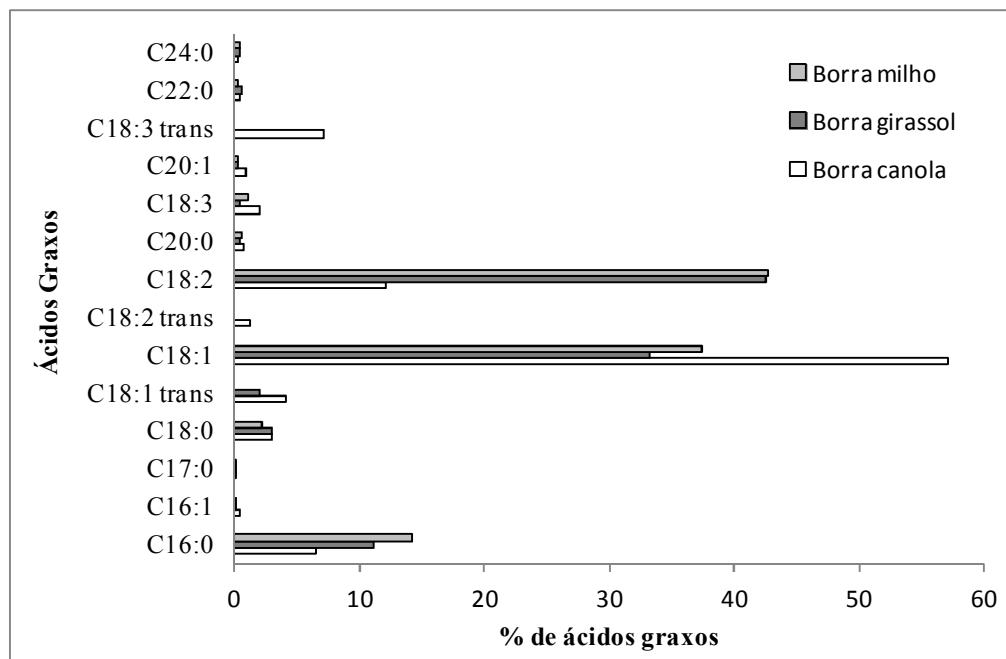
Observa-se na Figura 7, que os minerais ferro, cobre e potássio estão presentes em traços (< 0,02 g/100 g) em todas as borras. O íon sódio se destaca na borra de girassol com 2,8%.

Teor de 0,04% de fósforo foi encontrado para a borra de girassol, porém para essa mesma borra, Kuk e Ballew (1999) encontraram uma faixa de 0,90-0,98% de fósforo.

Na borra de milho foram encontrados 1,9% de sódio e 0,08% de fósforo, comparativamente, Dowd (1998) encontrou valores de 4,56% de sódio e 0,89% de fósforo para a mesma borra.

Na Figura 8 podem ser visualizados os ácidos graxos encontrados em cada borra detectados por cromatografia gasosa. Na borra de milho predominam sequencialmente os

ácidos graxos linoléico (C 18:2), 42,75%; oléico (C 18:1), 37,37%; palmítico (C 16:0), 14,23%; e esteárico (C 18:0), 2,21%, como encontrado por Dowd (1998) quando analisou o perfil em ácidos graxos para a borra de milho e os principais ácidos graxos detectados foram linoléico (48,9%), oléico (25,7%), palmítico (23,7%) e esteárico (1,4%).



**Figura 8** Perfil em ácidos graxos dos óleos presentes nas borras.

As borras de girassol e de milho apresentaram predominância nos ácidos graxos linoléico (42,6% e 42,7%, respectivamente) e oléico (33,2% e 37,4%, respectivamente), assim como seus respectivos óleos, porém com valores distintos como apresentado por Jorge et al. (2005) que para os óleos de girassol e de milho, os teores de ácido linoléico foram de 67,78% e 52,20%, respectivamente, seguido do ácido oléico com 21,09% e 32,20%, respectivamente.

A borra de canola apresentou predominância dos ácidos graxos oléico (57,19%), seguido pelo linoléico (12,0%) e por último o palmítico (6,6%). Os valores e ordem de predominância de substância foram diferentes das elucidadas por Durant, Dumont e Narine (2006) para a mesma borra, onde a principal substância encontrada foi o ácido oléico (15,57 g/100 g), seguido pelo ácido palmítico (4,63 g/100 g) e linoléico (3,31 g/100 g). Os autores atribuem a alta proporção de ácido palmítico à hidrólise química e enzimática que ocorrem na molécula do triacilglicerol do óleo bruto de canola, pois a hidrólise enzimática inicia na semente, logo após a colheita.

Os resultados mostrados na Figura 8 têm, em geral, pouca relação com o esperado para os óleos de canola, de milho e de girassol, em virtude da degradação que ocorre no processo de neutralização de óleos, que altera a composição em ácidos graxos.

## 5.2 Produção da Enzima Lipase por *A. niger* 11T53A14 Utilizando FES

A escolha do processo de FES implica em selecionar micro-organismos que se adaptem ao processo, substratos ideais para reprodução do mesmo, e condições experimentais que permitam a obtenção dos compostos de interesse.

Vários fatores influenciam na síntese da lipase pelos micro-organismos, porém neste trabalho, foram considerados alguns fatores como: concentração de nitrogênio, de inóculo e de indutor e volume de solução de sulfato de amônio que foram selecionados como variáveis para análise de seus efeitos no processo fermentativo.

O delineamento fatorial fracionado (DFF),  $2^{4-1}$  foi utilizado para obter resultados preliminares da atividade lipásica e da atividade específica aparente, selecionando o melhor indutor e avaliar a influência das variáveis estudadas na produção de lipase, sendo estas, volume de solução de sulfato de amônio (VSSA), concentração de inóculo, de nitrogênio e de indutor.

### 5.2.1 Seleção da melhor borra indutora através do DFF

Utilizando o fungo filamentoso *A. niger* em meio de farelo de trigo, foi realizado primeiramente planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  (descrito no item 4.3.1) com 3 pontos centrais (9, 10 e 11) para avaliar o efeito das 4 variáveis na produção de lipase em FES, objetivando primeiramente selecionar a melhor borra.

As variáveis utilizadas no DFF com os seus níveis reais e codificados e a matriz dos ensaios realizados foram apresentados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente. Foram testadas três borras, de canola, girassol e milho, utilizadas separadamente como indutoras para produção da enzima lipase. A escolha da melhor borra foi baseada nos resultados de atividade enzimática.

A utilização da borra, já havia se mostrado promissora em trabalhos realizados por Damaso et al. (2008) e Macedo et al. (2009).

Nas Tabelas 14 e 15 apresentam-se os resultados de atividades lipásica e específica aparente, respectivamente, obtidos utilizando-se as três borras. Enquanto que, para fins informativos e comparativos, na Tabela 16 apresenta-se os resultados de atividade lipásica somente da borra de girassol, melhor indutora em U/mL.

A atividade lipásica, na condição do ensaio 8DFF ( $10^8$  esporos/g<sub>m</sub>, 3% de borra e 0,5% de nitrogênio presente em 80 mL de SSA-solução de sulfato de amônio) foi maior para todos os experimentos, exceto para a borra de canola que teve como melhor condição a do ensaio 3DFF ( $10^6$  esporos/g<sub>m</sub>, 3% de borra e 0,1% de nitrogênio presente em 80 mL de SSA). Já o ensaio 5DFF ( $10^8$  esporos/g<sub>m</sub>, 3% de borra e 0,1% de nitrogênio presente em 40 mL de SSA) apresentou a pior condição experimental para os ensaios utilizando todas as borras.

A borra de girassol se destacou como a melhor produtora de lipase com resultado máximo de atividade lipásica de 201,82 U/g<sub>ms</sub>, para o ensaio 8DFF (0,5% de nitrogênio, 80 mL de SSA,  $10^8$  esporos/g<sub>m</sub> e 3,0 % de borra de girassol). Com relação a atividade específica, na qual se considera o total de proteína presente no extrato enzimático bruto, a borra de girassol também foi o melhor indutor, dentre as borras testadas. A maioria dos resultados obtidos com essa borra foram superiores aos encontrados pelas demais borras.

**Tabela 14** Atividades lipásicas obtidas em FES utilizando como indutores as borras de canola, milho e girassol.

Atividade lipásica (U/g <sub>ms</sub> )						
Ensaio	Borra de canola		Borra de milho		Borra de girassol	
1DFF	96,69	±0,03	75,94	±1,05	123,16	±0,10
2DFF	107,08	±0,56	75,51	±0,60	89,91	±0,04
3DFF	183,45	±3,00	140,98	±3,04	157,10	±4,40
4DFF	137,04	±1,31	135,23	±3,24	154,69	±1,42
5DFF	41,75	±4,11	48,62	±0,43	90,90	±0,80
6DFF	58,78	±2,36	69,52	±0,68	162,55	±0,77
7DFF	95,65	±1,01	81,20	±3,22	151,39	±0,87
8DFF	140,50	±0,83	171,41	±2,92	201,81	±0,33
9DFF	88,80	±0,10	134,63	±1,53	172,84	±0,39
10DFF	87,64	±1,67	144,59	±1,28	162,86	±3,19
11DFF	93,97	±6,45	130,09	±1,13	170,08	±7,91

**Tabela 15** Atividades específicas aparentes obtidas em FES utilizando como indutores as borras de canola, milho e girassol.

Atividade específica aparente (U/g de proteína)						
Ensaio	Borra de canola		Borra de milho		Borra de girassol	
1DFF	3448,32	±1,24	3166,69	±43,72	6760,55	±5,24
2DFF	4282,74	±22,28	4243,28	±33,49	7075,36	±3,06
3DFF	5324,36	±87,18	4862,43	±104,99	5293,81	±148,19
4DFF	4321,75	±41,17	4904,15	±117,37	6125,36	±56,35
5DFF	1347,00	±132,63	1545,53	±13,53	2783,18	±24,39
6DFF	1718,27	±68,89	1867,56	±65,23	4453,98	±20,98
7DFF	2671,76	±28,29	2124,51	±84,11	3418,84	±19,65
8DFF	3550,06	±20,92	4902,15	±83,37	6003,40	±9,74
9DFF	2727,63	±3,05	4285,04	±48,79	4413,44	±10,02
10DFF	2595,97	±49,34	3777,01	±33,43	4057,86	±79,45
11DFF	2842,15	±194,93	3105,24	±26,89	4889,12	±227,28

Os ácidos graxos (incluindo o presente em óleos) têm importantes impactos sobre a produção de lipases, e segundo Wang, Xu e Shan (2008), o ácido graxo linoléico proporciona aumento na atividade lipásica, porém essa atividade pode ser significativamente maior na presença do ácido oléico. Portanto, ao comparar as atividades



da borra de girassol e de canola, na primeira observa-se a presença desses dois ácidos graxos, oléico e linoléico (Figura 8), em boas quantidades quando comparada com a borra de canola, que só tem o ácido oléico e cuja presença do ácido linoléico é nula. Esse fator pode ter sido o diferencial para maior atividade lipásica no processo fermentativo utilizando a borra de girassol.

Kumar et al. (2011a) atribuíram o aumento da atividade enzimática à proporção de ácidos graxos insaturados, como o oléico, linoléico e linolênico (C 18:3), maior que a de ácidos graxos saturados (como o esteárico e o palmítico).

Entre a borra de girassol e a de milho, ocorre pouca diferença no perfil dos ácidos graxos, no entanto a explicação para a melhor atuação da borra de girassol pode estar no fato da mesma possuir maior quantidade de íon sódio (Figura 7). A presença de cátions é fator benéfico para o crescimento do fungo e produção da enzima (DAMASO et al., 2008).

No trabalho de Lin, Wang e Sung (2006) foram utilizados íons metálicos como aditivo no meio de fermentação para produção da enzima lipase por *Antrodia cinnamomea*, e o efeito estimulatório e inibitório desses íons foi avaliado. Os íons foram adicionados na concentração de 0,1% (m/v), e a atividade da lipase aumentou na presença de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+2}$  ou  $\text{K}^{+2}$ , em contrapartida, em meio contendo  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ou  $\text{Li}^{+2}$  não foi detectada produção de lipase. Os efeitos dos íons metálicos também foram estudados por Diaz et al. (2006) na atividade da lipase em FES por fungo *Rhizopus homothallicus*. Dentre os íons testados, o  $\text{Mn}^{+2}$  aumentou a atividade da enzima (27-39%), enquanto o  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$  não tiveram efeito sobre a lipase.

Com a borra de milho, o máximo de atividade encontrado foi de 170 U/g<sub>ms</sub> (Tabela 14). Damaso et al. (2008) utilizando o mesmo mutante *A. niger* 11T53A14, encontraram uma atividade lipásica de 62,7 U/g<sub>ms</sub> utilizando a mesma borra, no entanto, o processo fermentativo foi conduzido por 48 h em frascos cônicos em estado estacionário, sem aeração, diferente do que ocorre na FES em colunas. A aeração pode ter sido um fator relevante neste processo, uma vez que tem influência comprovada no aumento da atividade enzimática, como relatado por Macedo et al. (2009) e tem sua importância descrita por Graminha et al. (2008) como essencial para oxigenação, remoção de CO<sub>2</sub>, dissipação de calor (regulação da temperatura do meio), distribuição de vapor de água (regulação da umidade) e distribuição de compostos voláteis produzidos durante o metabolismo.

Martins et al. (2008) produziram lipase por *A. fumigatus* em colunas aeradas em FES e em frascos cônicos por 120 h de fermentação utilizando óleo de soja e encontraram valor de atividade lipásica igual a 119,46 U/g<sub>ms</sub> e 100 U/g<sub>ms</sub>, respectivamente. Em condições submersas, Dheenana, Frias e Henahan (2009) produziram lipase de *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304, com 96 h de fermentação, obtendo atividade de 1,37 U/mL. Esses resultados demonstram que a FES é uma boa estratégia de processo e que o uso de colunas aeradas propicia aumento na atividade enzimática.

Salihu et al, (2011) produziram lipase por *Candida cylindracea* em frascos cônicos utilizando como meio de fermentação o efluente da indústria de óleo de palma e obtiveram o máximo de atividade de 20,26 U/mL. A atividade encontrada por eles foi inferior às encontradas neste trabalho em todos os ensaios para a borra de girassol (Tabela 16). Isso pode indicar que tanto o indutor quanto o micro-organismo utilizado são favoráveis no aumento da atividade enzimática.

Dutra et al. (2008) também utilizaram o mutante *A. niger* 11T53A14 induzido com óleo de mamona, em frascos cônicos, com 96 h de FES com farelo de trigo e obtiveram atividade também inferior (23,7 U/mL) quando comparada a maior atividade encontrada nesse trabalho com borra de girassol (37,5 U/mL) (Tabela 16), o que pode estar relacionado, além da aeração, com o indutor utilizado em cada processo.

**Tabela 16.** Atividade lipásica (U/mL) utilizando como indutor a borra de girassol

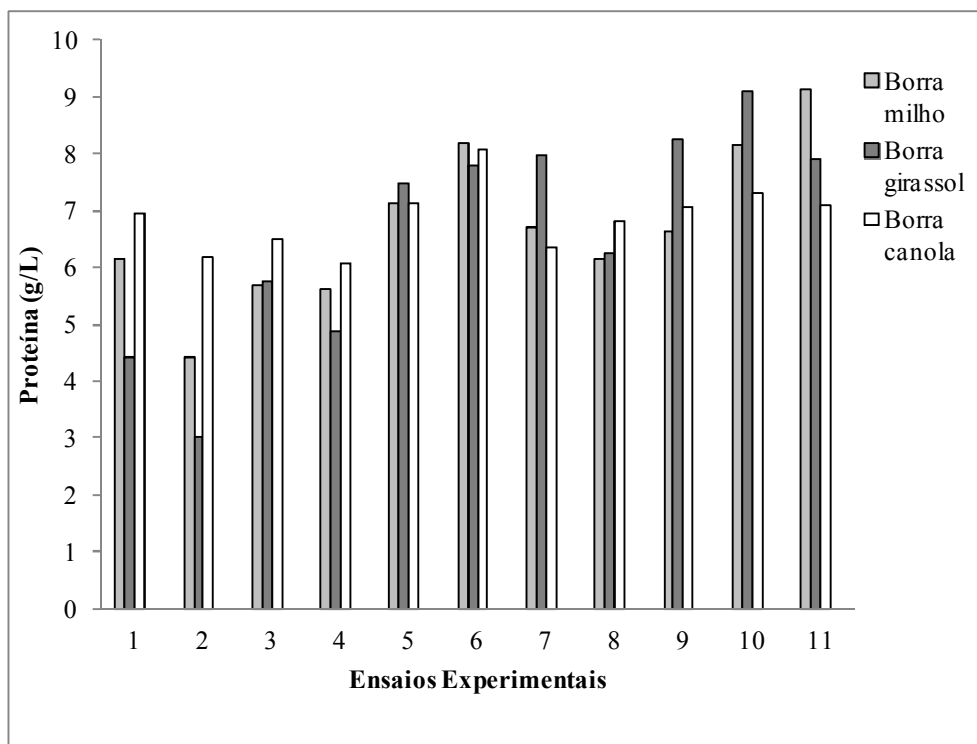
Ensaio	Atividade lipásica (U/mL)
1DFF	30,00
2DFF	21,46
3DFF	30,55
4DFF	29,81
5DFF	20,83
6DFF	34,68
7DFF	27,22
8DFF	37,51
9DFF	36,38
10DFF	36,85
11DFF	36,57

Alta produção de lipase foi reportada por Mahadik et al. (2002) com atividade de 630 U/g<sub>ms</sub> utilizando *A. niger* NCIM 1207 por FES em frascos cônicos, com meio de farelo de trigo e óleo de oliva. Esses autores relataram que o uso do agente tensoativo Triton X-100 ajudou a aumentar a produção de enzimas e a elevação da atividade pode ser atribuída ao aumento da permeabilidade da célula por esse agente. Segundo esses autores, similar efeito foi observado quando a extração enzimática foi realizada com NaOH suplementado com Triton X-100.

Mahanta, Gupta e Khare (2008) também encontraram alto valor de atividade lipásica (625 U/g<sub>m</sub>) utilizando como substrato o bolo de semente de pinhão manso com 50% de umidade, o processo ocorreu em FES por 120 h. A fermentação foi realizada com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*

Na atividade específica aparente, como se considera o total de proteínas presente no extrato enzimático bruto, não é possível saber quantitativamente, quanto do total de proteína corresponde a enzima lipase, em virtude dela não estar purificada. Analisando os resultados, o maior valor de atividade foi encontrado também para a borra de girassol (7075,36 U/g de proteína), porém para o ensaio 2DFF (0,5% de nitrogênio, 40 mL de SSA, 10<sup>6</sup> esporos/g<sub>m</sub> e 3,0 % de borra de girassol), diferente do encontrado para a atividade da enzima. Todavia, como ponto de partida para os experimentos futuros de otimização foi considerado somente os resultados da atividade lipásica.

O fungo *Aspergillus niger* excreta diversas enzimas entre elas estão celulases, xilanases (AGUIAR e MENEZES, 2000), amilases, proteases (PAPAGIANNI e MOO-YOUG, 2002), fitases (PAPAGIANNI, NOKES e FILER, 1999), poligalacturonases (SOUZA et al., 2010), pectinases (SURESH e VIRUTHAGIRI, 2010) e lipases (JAYAPRAKASH e EBENEZER, 2010). O total de proteína extracelular (g/L) liberada ao meio pelo micro-organismo nos experimentos utilizando as 3 borras (canola, milho e girassol) em distintas condições foi apresentado na Figura 9. Esses resultados foram utilizados, como base, para os cálculos de atividade lipásica específica aparente apresentada na Tabela 15.



**Figura 9** Proteína total (g/L) quantificada nas borras de canola, milho e girassol nos 11 ensaios experimentais.

Na Tabela 17 observa-se os resultados da determinação da atividade (U/mL) da enzima protease. A atividade proteolítica expressa a ação da protease, sobre as proteínas contidas no extrato, inclusive a enzima de interesse, a lipase. A protease presente no extrato enzimático pode influenciar na perda de atividade enzimática como mencionara Azeredo et al. (2001), devido à sua ação hidrolítica sobre outras enzimas. Portanto, a falta de atividade proteolítica favorece a estabilidade da solução enzimática (COURI et al., 2000), sendo assim, é interessante que o valor encontrado de atividade proteolítica seja baixo.

Dos resultados apresentados na Tabela 17, a atividade da enzima protease varia de 13,8 a 57,2 U/g<sub>ms</sub> (2,8 a 10,28 U/mL) o que significa que as condições estudadas (item 4.3.1) influenciaram nas variações da atividade da enzima protease.

Castro (2006) elucidou que dos micro-organismos avaliados (*A. niger* ATCC 16404, *P. funiculosum* ATCC 11797, *Trichoderma harzianum* IOC 3844 e *T. harzianum* IOC 4038), somente os extratos enzimáticos produzidos por *A. niger* apresentaram atividade proteásica (2,30 U/L) sobre o substrato avaliado. Isto é coerente, visto que diversas espécies desse gênero, como *A. oryzae*, *A. sojae* e *A. saitoi* são utilizadas na obtenção de proteases comerciais (SIGMA, 2002).

Nas Tabelas, 14, 15, 16 e 17 apresentadas neste item, os ensaios 9, 10 e 11 DFF são os pontos centrais dos experimentos. Estes ensaios têm como objetivo verificar a qualidade da repetibilidade do processo, quanto mais próximos eles estão, melhores são os resultados. No entanto, em muitos casos, eles não foram semelhantes, o que significa baixa reprodutibilidade dos ensaios. Isso se deve às dificuldades encontradas no processo de FES, como a baixa homogeneidade do meio; a dificuldade de ajuste da aeração devido a baixa sensibilidade do rotâmetro; a compactação do sólido na coluna do reator que

consequentemente impede a difusão de gases no meio; e pode ocorrer a má distribuição do inóculo na coluna do reator.

**Tabela 17** Atividade proteásica presente no extrato enzimático obtido na FES, para cada borra testada.

Atividade proteásica (U/g <sub>ms</sub> )						
Ensaio	Borra de canola		Borra de milho		Borra de girassol	
1DFF	20,4	±1,1	15,9	±0,4	25,1	±0,2
2DFF	17,9	±0,7	18,1	±0,5	13,9	±0,3
3DFF	30,9	±0,1	27,3	±0,3	39,5	±0,3
4DFF	15,3	±0,8	13,8	±0,1	20,8	±0,3
5DFF	44,5	±0,3	38,9	±1,2	31,2	±0,2
6DFF	29,5	±0,1	29,4	±0,6	28,3	±0,2
7DFF	39,3	±0,6	28,9	±0,4	57,2	±0,7
8DFF	26,5	±0,5	31,0	±0,65	43,5	±0,0
9DFF	36,8	±1,6	37,5	±0,5	35,3	±0,3
10DFF	35,1	±0,8	42,7	±0,9	33,4	±0,2
11DFF	33,7	±0,0	40,3	±0,7	32,4	±0,4

### 5.2.2 Estudo dos efeitos das borras de canola, milho e girassol na atividade enzimática

O delineamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  (item 4.3.1), cujos resultados foram apresentados no item 5.2.1 foi também utilizado para identificar os efeitos das variáveis estudadas sobre as respostas desejadas. Teve como objetivo, calcular os efeitos principais dos experimentos com as três borras, selecionar e avaliar as variáveis que influenciaram significativas na atividade enzimática da melhor borra, a fim de seguir para um novo planejamento experimental de otimização (DCCR), como novas faixas de valores.

Devido a grande heterogeneidade do meio de fermentação no estado sólido, além das variações inerentes ao processo de produção da enzima que envolve a ação de um micro-organismo como agente de fermentação, foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 10% ( $p < 0,1$ ). Nas Tabelas 18 e 19 estão apresentadas as estimativas dos efeitos das variáveis sobre as atividades lipásica e específica aparente para a borra de canola, respectivamente.

As variáveis VSSA e concentração de inóculo (Tabelas 18 e 19) apresentaram efeitos significativos nas atividades lipásica e específica aparente, a um nível de confiança de 90%. As variáveis concentração de nitrogênio e concentração de indutor não apresentaram efeitos significativos, enquanto a concentração de inóculo apresentou efeito negativo e o VSSA apresentou efeito positivo. Isto mostrou que para aumentar a atividade utilizando a borra de canola devem-se aumentar os valores das variáveis VSSA e concentração de indutor e diminuir a concentração de inóculo.

**Tabela 18** Estimativa dos efeitos para a atividade lipásica usando a borra de canola.

Variáveis	Efeito (U/g <sub>ms</sub> )	Erro Padrão	t(6)	p
Média*	102,85	5,55	18,51	0,0000
Nitrogênio	6,47	13,03	0,49	0,6373
VSSA*	63,01	13,03	4,84	0,0028
Inóculo*	-46,89	13,03	-3,60	0,0113
Indutor	21,15	13,03	1,62	0,1556

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)

VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

**Tabela 19** Estimativa dos efeitos para a atividade específica aparente da enzima lipase usando a borra de canola.

Variáveis	Efeito (U/g <sub>ms</sub> )	Erro Padrão	t(6)	p
Média*	3166,36	151,27	20,93	0,0000
Nitrogênio	270,34	354,75	0,76	0,4749
VSSA*	1267,90	354,75	3,57	0,0117
Inóculo*	-2022,52	354,75	-5,70	0,0012
Indutor	586,02	354,75	1,65	0,1496

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)

VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

Foi feita a análise estatística dos resultados de atividades lipásica e específica aparente para a borra de milho. Nas Tabelas 20 e 21 são mostradas as estimativas dos efeitos das variáveis sobre estas respostas. Na análise apresentada na Tabela 20 somente a variável VSSA apresentou efeito significativo e positivo na atividade da enzima lipásica, a um nível de confiança de 90%. As outras variáveis: concentração de nitrogênio, de indutor e de inóculo não apresentaram efeitos significativos com p-valor menor que 10% ( $p < 0,1$ ). O aumento da atividade lipásica seria possível com o aumento no valor do VSSA.

**Tabela 20** Estimativa dos efeitos para a atividade lipásica usando a borra de milho.

Variáveis	Efeito (U/g <sub>ms</sub> )	Erro Padrão	t(6)	p
Média*	109,80	8,95	12,27	0,0000
Nitrogênio	26,23	20,98	1,25	0,2578
VSSA*	64,81	20,98	3,09	0,0214
Inóculo	-14,23	20,98	-0,68	0,5229
Indutor	18,66	20,98	0,89	0,4081

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)

VSSA = volume de solução de sulfato de amônio.

Contrariamente, nos resultados obtidos na análise estatística de atividade específica aparente (Tabela 21) para a borra de milho, todas as outras variáveis (VSSA, concentração de inóculo, de indutor e de nitrogênio) foram significativas a um nível de confiança de 90% e os efeitos foram positivos, exceto para concentração de inóculo. Isso mostrou que para aumentar a atividade específica aparente deve-se aumentar a concentração de nitrogênio, de indutor e o VSSA, em contrapartida, deve-se diminuir a concentração de inóculo, cujo efeito é negativo.

**Tabela 21** Estimativa dos efeitos para a atividade específica aparente da enzima lipase usando a borra de milho.

Variáveis	Efeito (U/g <sub>ms</sub> )	Erro Padrão	t(6)	p
Média*	3525,78	165,17	21,34	0,0000
Nitrogênio*	1054,50	387,35	2,72	0,0345
VSSA*	1492,54	387,35	3,85	0,0084
Inóculo*	-1684,2	387,35	-4,35	0,0048
Indutor*	872,62	387,35	2,25	0,0652

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)

VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

Da mesma forma, foi realizada a análise estatística dos resultados de atividade lipásica e específica aparente para a borra de girassol. Os resultados das estimativas dos efeitos das variáveis sobre estas respostas são mostrados nas Tabelas 22 e 23, respectivamente.

**Tabela 22** Estimativa dos efeitos para a atividade lipásica usando a borra de girassol.

Variáveis	Efeito (U/g <sub>ms</sub> )	Erro Padrão,	t(6)	p
Média*	148,85	8,51	17,48	0,0000
Nitrogênio	21,60	19,96	1,08	0,3208
VSSA*	49,62	19,96	2,48	0,0474
Inóculo	20,45	19,96	1,02	0,3453
Indutor	-13,02	19,96	-0,65	0,5386

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)

VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

Dentre as 4 variáveis estudadas somente o VSSA foi estatisticamente significativo ( $p < 0,10$ ) para a resposta atividade lipásica utilizando a borra de girassol. Essa variável produz efeito positivo sobre a atividade, o que indica que ao aumentar seu valor aumenta a atividade lipásica. As outras variáveis: concentração de nitrogênio, de inóculo e indutor não foram estatisticamente significativos no intervalo de confiança de 90%.

**Tabela 23** Estimativa dos efeitos para a atividade específica aparente da enzima lipase usando a borra de girassol.

Variáveis	Efeito (U/g <sub>ms</sub> )	Erro Padrão	t(6)	p
Média*	5024,99	296,60	16,94	<0,0000
Nitrogênio*	1350,43	695,60	1,94	0,1002
VSSA	-57,92	695,60	-0,08	0,9363
Inóculo*	-2148,92	695,60	-3,09	0,0214
Indutor	99,25	695,60	0,14	0,1427

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)

VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

Na análise dos efeitos para a resposta atividade específica aparente, as variáveis concentração de nitrogênio e concentração de inóculo foram significativas a um intervalo

de confiança de 90%. No entanto, as variáveis VSSA e concentração de indutor não produziram efeito estatístico sobre a resposta avaliada a  $p < 0,10$ . Enquanto a variável concentração de nitrogênio apresentou efeito positivo, indicando que ao aumentar a concentração aumentaria a atividade específica aparente da enzima lipase. A variável concentração de inóculo apresentou efeito negativo, indicando que a diminuição do valor dessa variável acarretaria o aumento da atividade.

Como o objetivo deste trabalho era aumentar os níveis de atividade enzimática da lipase produzidas pelo fungo *A. niger*, para elaboração do próximo delineamento experimental foram levados em consideração os resultados das análises estatísticas dos dados da borra de girassol para a atividade lipásica e atividade específica aparente, uma vez que essa borra foi comprovada como o melhor indutor da enzima (item 5.2.1).

A atividade enzimática pode ser melhorada testando-se valores maiores de concentração de nitrogênio e VSSA e baixa concentração de inóculo usando a borra de girassol, como demonstrado na análise dos efeitos (Tabelas 22 e 23). Desta forma, essas variáveis foram selecionadas e estudadas através de novo planejamento (DCCR).

A variável concentração de indutor não apresentou efeito sobre as duas respostas analisadas (atividades lipásica e específica aparente), portanto para avaliar se a presença da borra como substrato lipídico, contribui na elevação da atividade enzimática, foi realizado um novo planejamento experimental fatorial completo sem pontos axiais, tendo em vista, comparar as atividades da enzima com e sem a presença de indutor, bem como analisar o comportamento do fungo quanto à produção da enzima lipase sem o uso da borra (5.2.3).

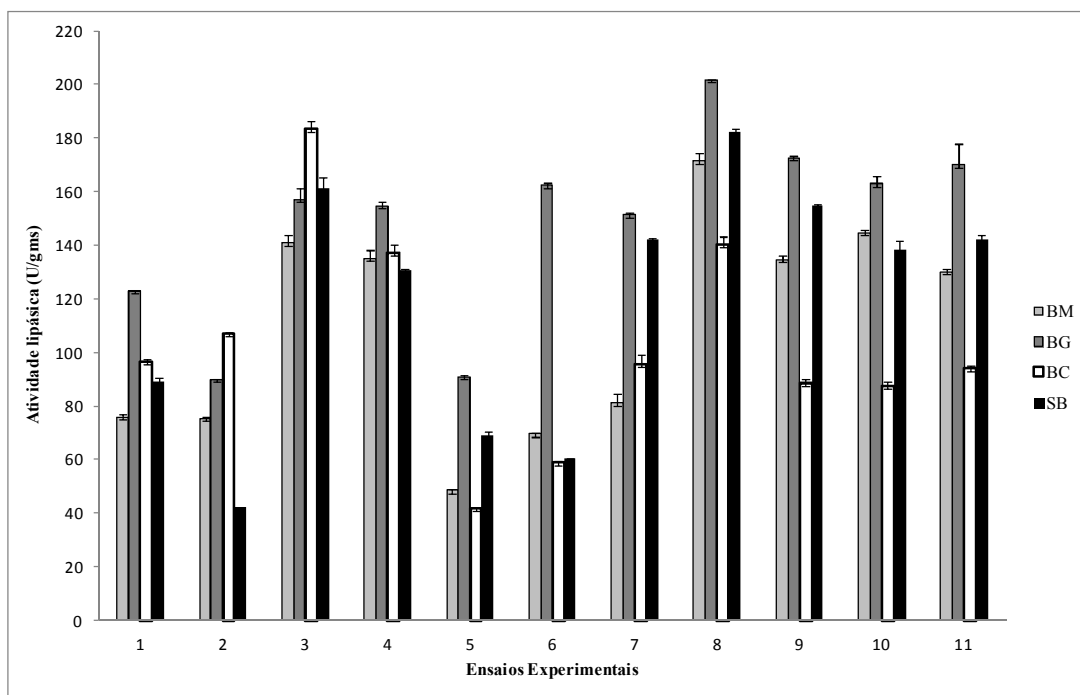
### **5.2.3 Produção de lipase sem a presença de indutor (borra)**

Com o objetivo de avaliar o comportamento do fungo *A. niger* na produção da enzima sem a presença de substrato lipídico, uma vez que a borra não apresentou significância para produção da enzima (5.2.2) foi realizado um delineamento fatorial completo  $2^3$  (item 4.3.2), com as mesmas variáveis (concentração de inóculo e de nitrogênio e VSSA) nas concentrações estudadas anteriormente, exceto a presença do indutor.

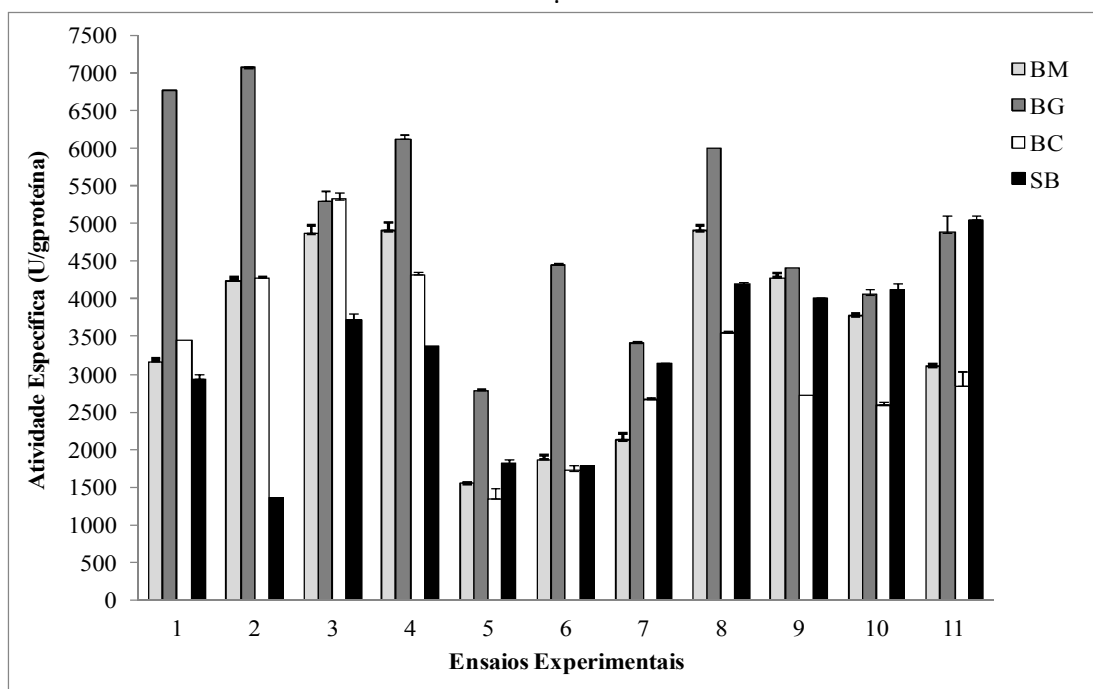
Nas Figuras 10 e 11 observa-se os valores de atividades lipásica e específica aparente encontrados para os experimentos de produção da lipase em FES na presença e ausência do indutor, respectivamente. Comparando-se os resultados obtidos, verificou-se que o fungo *A. niger* produz a lipase mesmo na ausência do indutor (borra). Isso pode ocorrer porque o meio utilizado na fermentação, farelo de trigo, já apresenta em sua composição certa quantidade de lipídeos (2,8%) (FERNANDES, 2007) que podem estar agindo como indutores.

Em contrapartida, Colin, Baigori e Pera (2010) através da FS utilizando *A. niger* MYA 135 em frascos cônicos inoculado com  $10^5$  esporos/mL em meio de cultura básico incubado por 4 dias não produziram lipase extracelular nessas condições, a lipase somente foi detectada em presença de óleos vegetais como substrato lipídico.

A condição do ensaio 8DFC ( $10^8$  esporos/g<sub>m</sub>, 0,5% de nitrogênio presente em 80 mL de SSA) foi a melhor para o experimento sem a presença da borra (sem indutor) para o resultado de atividade lipásica (Figura 10). Já o ensaio 5DFC ( $10^8$  esporos/g<sub>m</sub>, 0,1% de nitrogênio presente em 40 mL de SSA) apresentou a pior condição para produção da enzima para a mesma atividade. Esse último resultado pode relacionar-se a baixa quantidade de inóculo e principalmente a baixa quantidade de VSSA (que é uma variável significativa), porque os ensaios 1, 2, 5 e 6DFC, têm os menores volumes de solução e apresentaram as piores atividades.



**Figura 10** Comparação dos resultados de atividade lipásica (U/gms) dos experimentos com sem borra do DFC (BC= borra de canola, BM=borra de milho, BG= borra de girassol e SB= experimento sem borra).



**Figura 11** Comparação dos resultados de atividade específica (U/g de proteína) dos experimentos com e sem borra do DFC (BC= borra de canola, BM=borra de milho, BG= borra de girassol e SB= experimento sem borra).

A maioria dos resultados de atividade enzimática dos experimentos sem o uso de indutor foi alto quando comparados com os valores encontrados utilizando as borras.



Como os resultados das maiores atividades lipásicas com (201,81 U/g<sub>ms</sub>) e sem a borra (182,35 U/g<sub>ms</sub>) foram próximos, foi realizado uma análise estatística, através do teste de Tukey (Tabela 24), que comprovou haver diferença significativa ao nível de 95% de significância entre esses resultados, o que implica na importância do substrato lipídico para melhorar a atividade lipásica.

Como explicou Gonçalves (2007), os substratos lipídicos e seus metabólitos (ácidos graxos de cadeia longa) participam da síntese de lipase.

O óleo contido no farelo de trigo (FERNANDES, 2007) é bem menos disponível do que o óleo adicionado através da borra alcalina, portanto sua presença é necessária para induzir, ao máximo, a produção da lipase. A adição da borra aumentou de forma significativa (Tabela 24) a produção de enzima.

**Tabela 24** Resultado do Teste de Tukey para comparação das médias entre os maiores valores de atividade lipásica do experimento sem e com borra de girassol

Amostras	Médias (U/g <sub>ms</sub> )	Resultados
Borra de girassol	201,8	A
Sem borra	182,3	B

DMS: 0,889

A presença de íons metálicos na borra como magnésio (Mg<sup>2+</sup>), sódio (Na<sup>+</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>) são benéficos para a biossíntese de lipases (BALAJI e EBENEZER, 2008). Essa constatação também foi afirmada por Pessoa et al. (2003), que afirmaram que concentrações mínimas de íons no subproduto, tendem a contribuir positivamente no metabolismo do micro-organismo devido a esses íons constituírem-se em co-fatores de inúmeras enzimas.

Porém, no trabalho feito por Yadav et al. (2011), a presença de íons metálicos não demonstrou ser um requisito obrigatório para a atividade da lipase produzida por *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639, compatível com o que ocorreu neste experimento conduzido sem a presença de borra.

A análise dos efeitos das variáveis estudadas e as interações entre elas para o experimento sem indutor são mostradas nas Tabelas 25 e 26. Ao analisar a estimativa dos efeitos sobre a resposta atividade lipásica pôde-se observar que somente a variável VSSA exerceu efeito significativo e positivo ao nível de 90% de significância, ou seja, o aumento do valor da variável VSSA implicaria no aumento da atividade lipásica. Já para a atividade específica aparente nenhuma variável foi significativa com p-valor menor que 10% (p < 0,1).

**Tabela 25** Estimativa dos efeitos para a atividade lipásica no experimento conduzido sem o uso de indutor.

Variáveis	Efeito (U/g <sub>ms</sub> )	Erro Padrão	t(4)	p
Média*	119,46	8,27	14,43	0,0000
(1) Nitrogênio	-11,13	19,41	-0,57	0,5969
(2) VSSA*	89,13	19,41	4,59	0,0100
(3) Inóculo	7,89	19,41	0,40	0,7049

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)  
VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

**Tabela 26** Estimativa dos efeitos para a atividade específica aparente no experimento conduzido sem o uso de indutor.

Variáveis	Efeito (U/g <sub>ms</sub> )	Erro Padrão	t(4)	p
Média*	3229,08	376,12	8,58	0,0010
(1) Nitrogênio	-221,27	882,08	-0,25	0,8143
(2) VSSA	1628,31	882,08	1,84	0,1386
(3) Inóculo	-114,47	882,08	-0,13	0,9030

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)  
VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

A variável VSSA exerceu influência positiva somente sobre a atividade lipásica esse fato também pode ser observado através da Tabela 27, de coeficiente de regressão, utilizada para construção do modelo.

A fim de verificar se o modelo é adequado para descrever os dados e construir as superfícies de respostas, foi realizada a análise de variância (ANOVA) conforme apresentado na Tabela 28.

**Tabela 27** Coeficiente de regressão para atividade lipásica no experimento conduzido sem o uso do indutor.

Variáveis	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(4)	p
Média*	119,46	8,27	14,43	0,0001
(1)Nitrogênio_	-5,56	9,70	-0,57	0,5969
(2)VSSA*	44,56	9,70	4,59	0,010
(3)Inóculo	3,94	9,70	0,40	0,7049
1 x2	8,29	9,70	0,85	0,4410
1 x3	13,69	9,70	1,41	0,2311
2 x 3	4,51	9,70	0,46	0,6659

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)  
VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

**Tabela 28** Análise de variância da atividade lipolítica para o experimento sem a presença de indutor.

Fonte de variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>
Regressão	15891,43	1	15891,43	25,53
Resíduo	5601,45	9	622,38	
Total	21492,88	10		

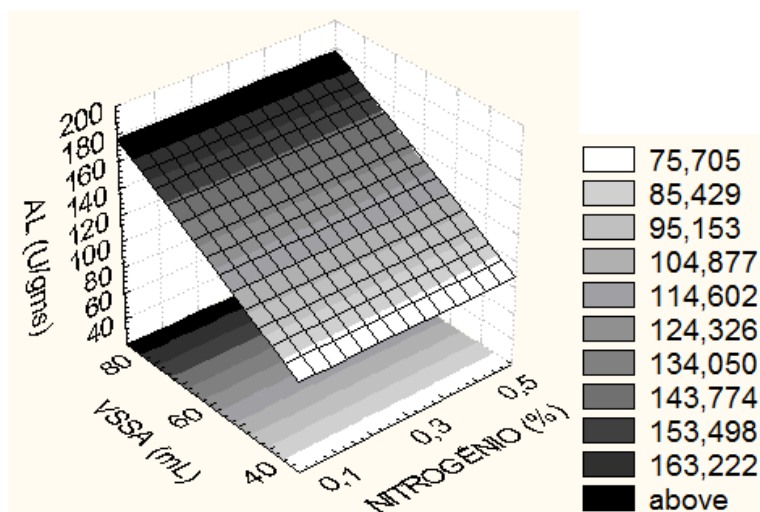
$$R^2 = 85,97; F_{(1; 9; 0,1)} = 3,36$$

Com os resultados da ANOVA (Tabela 28) verificou-se que o  $F_{\text{calculado}}$  ( $F_{\text{calc}}$ ) para a regressão foi igual a 25,53 valor maior que o  $F_{\text{tabelado}}$  ( $F_{\text{tab}}$ ) 3,36 aproximadamente 8 vezes. A porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) pelo modelo foi boa (85,978%), portanto o modelo proposto pode ser validado pela análise de variância.

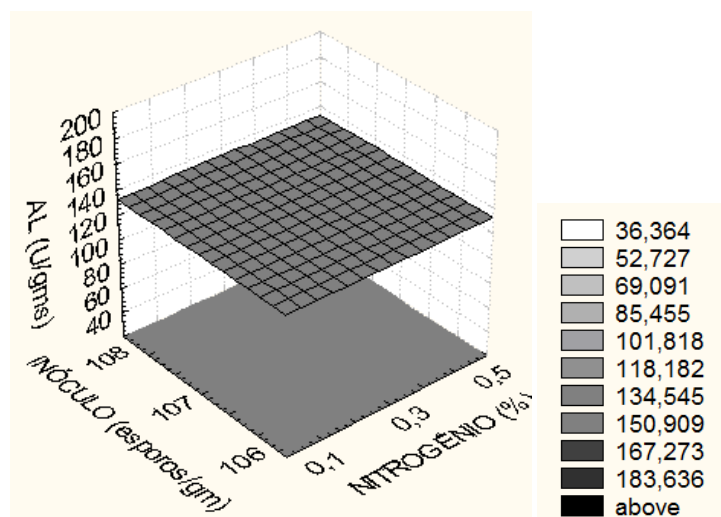
O modelo com a variável codificada, que representa a atividade lipolítica (U/g<sub>ms</sub>) em função da variável VSSA na faixa estudada, é apresentado na Equação 6, onde X<sub>1</sub> = VSSA:

$$\text{Atividade Lipolítica} = 141,20 - 16,78X_1 \quad (\text{Equação 6})$$

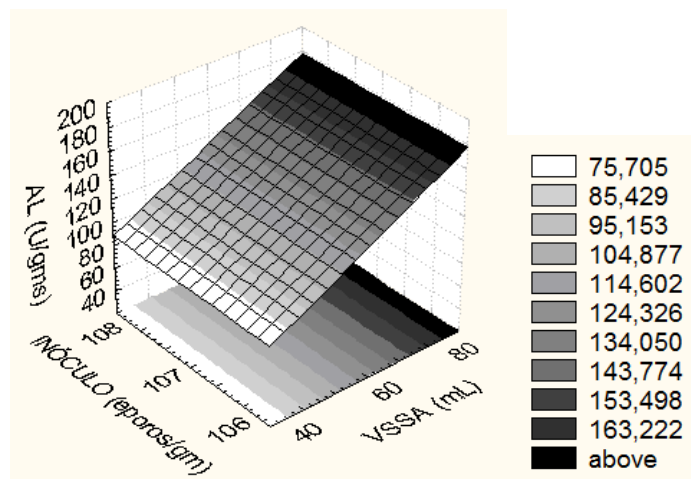
Como os modelos definidos para as atividades enzimáticas foram validados pôde-se construir a superfícies de respostas lineares para a atividade lipásica, apresentadas nas Figuras 12, 13 e 14 em função das variáveis: nitrogênio, VSSA e inóculo.



**Figura 12** Superfície de resposta para a atividade lipásica (AL) em função das variáveis VSSA e concentração de nitrogênio.



**Figura 13** Superfície de resposta para a atividade lipásica (AL) em função das variáveis concentração de nitrogênio e inóculo.



**Figura 14** Superfície de resposta para a atividade lipásica (AL) em função das variáveis VSSA e concentração de inóculo.

#### 5.2.4 Otimização da produção de lipase

A fim de aumentar os valores de atividade lipásica, o objetivo desta etapa do trabalho foi otimizar a produção da enzima utilizando a borra de girassol (selecionada anteriormente como a melhor indutora (item 5.2.1) e as variáveis pré-selecionadas (5.2.2) no delineamento fatorial fracionado que tiveram influência significativa sobre as atividades enzimática com a borra de girassol. Foram realizados 2 delineamentos central composto rotacional  $2^2$  na tentativa de otimizar a produção, conforme apresentado em seguida.

##### 5.2.4.1 Primeiro delineamento central composto rotacional (DCCR) $2^2$

Conforme indicado pelos resultados obtidos no item 5.2.2, para aumentar a produção da lipase, o valor da variável VSSA e concentração de nitrogênio deveriam ser deslocados para valores superiores. Essas variáveis foram selecionadas porque tiveram influência significativa no aumento da atividade enzimática. A variável concentração de inóculo também teve influência significativa na atividade enzimática, porém, não foi possível ajustar o valor dessa variável para os pontos axiais, em função da mesma não possibilitar valores fracionados. Desta maneira, em todos os ensaios deste DCCR, a concentração de inóculo foi fixada no menor valor do planejamento anterior:  $10^6$  esporos/g<sub>m</sub>, uma vez que tem efeito negativo, ou seja, quanto menor o valor dessa variável, maior a atividade.

Embora a variável concentração de indutor não tenha sido estatisticamente significativa ( $p < 0,1$ ), no planejamento fatorial fracionado (Tabelas 22 e 23), o indutor foi usado porque como foi visto no item 5.2.3 a presença da borra atua no aumento da atividade lipásica, sendo assim foi fixado valor baixo de 1%, uma vez que não tem efeito sobre as respostas analisadas.

Os valores de atividade lipásica (U/g<sub>ms</sub>) e específica aparente (U/g de proteína) podem ser observados na Tabela 29. Esses valores não foram maiores que os encontrados no primeiro delineamento para a borra de girassol (Tabelas 14 e 15), exceto para condição 8DCCR (0,6% de nitrogênio presente em 89,1 mL de SSA), cuja atividade lipásica obteve o maior resultado (215,91 U/g<sub>ms</sub>). Porém, segundo o teste de Tukey (Tabela 30), não houve diferença estatística significativa ao nível de 95% de confiança entre essa atividade e a

encontrada no primeiro delineamento fatorial com a borra de girassol (201,81 U/g<sub>ms</sub>). Isso comprova que a otimização não foi alcançada.

**Tabela 29** Atividade lipásica e específica aparente presente no extrato enzimático para borra de girassol referente ao primeiro DCCR.

<b>Ensaio</b>	<b>Atividade lipásica (U/g<sub>ms</sub>)</b>	<b>Atividade específica aparente (U/g de proteína)</b>
1DCCR	106,27	2996,59
2DCCR	69,43	2336,18
3DCCR	140,88	4335,89
4DCCR	108,33	3218,56
5DCCR	188,85	5117,42
6DCCR	126,21	3858,24
7DCCR	141,21	5555,56
8DCCR	215,00	6617,65
9DCCR	146,21	4874,48
10DCCR	138,28	4872,15
11DCCR	139,61	4700,89

**Tabela 30** Teste de Tukey para comparação das médias de atividade lipásica do DFF e do primeiro DCCR.

<b>Amostras</b>	<b>Médias (U/g<sub>ms</sub>)</b>	<b>Resultados</b>
Primeiro DFF	201,8	A
Primeiro DCCR	215,91	B

DMS= 28,51

No DCCR foram considerados significativos os parâmetros com 90% de significância ( $p < 0,1$ ). Nas Tabelas 31 e 32 são mostrados os coeficientes de regressão e desvio padrão dos ensaios para a atividade lipásica e específica aparente, respectivamente. Nas tabelas os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos letra à Q.

A partir dos resultados da análise estatística percebeu-se que, nenhuma variável foi significativa para as duas respostas analisadas.

**Tabela 31** Coeficiente de regressão do primeiro DCCR para atividade lipásica.

<b>Variáveis</b>	<b>Coefficiente de Regressão</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(5)</b>	<b>p</b>
Médias*	141,62	23,093	6,13	0,0016
(1) Nitrogênio (L)	-19,77	14,19	-1,39	0,2214
Nitrogênio (Q)	-7,70	16,90	-0,46	0,6675
(2) VSSA (L)	22,77	14,16	1,60	0,1687
VSSA (Q)	3,37	16,90	0,20	0,8496
1L x 2L	1,07	19,99	0,05	0,9593

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)

VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

**Tabela 32** Coeficiente de regressão do primeiro DCCR para atividade específica aparente.

Variáveis	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	t(6)	p
Médias*	4824,04	756,63	6,37	0,0014
(1) Nitrogênio (L)	-890,95	928,07	-0,96	0,3811
Nitrogênio (Q)	-1378,49	1107,43	-1,24	0,2683
(2) VSSA (L)	932,57	928,07	1,00	0,3610
VSSA (Q)	229,86	1107,43	0,20	0,8437
1L x2L	228,46	1310,53	-0,17	0,8684

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)

VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

Em relação à continuidade das análises estatísticas dos resultados de atividade lipásica e atividade específica aparente, como todas as variáveis não foram estatisticamente significativas com p-valor menor que 10% ( $p < 0,1$ ) (Tabelas 29 e 30), os resultados destas análises para o DCCR não foram apresentados. Desta forma, foi elaborado um segundo DCCR, no qual foram avaliadas as mesmas variáveis, porém foram alterados os valores das variáveis mantidas fixas após a realização do primeiro delineamento experimental (DCCR): concentração de inóculo e de indutor.

#### 5.2.4.2 Segundo delineamento central composto rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup>

Para uma segunda tentativa de otimizar a atividade enzimática, foi realizado outro DCCR com as mesmas variáveis estudadas: concentração de nitrogênio e VSSA, sem alterações nos seus valores. No entanto, as variáveis fixas, concentração de indutor e de inóculo foram alteradas para 3% e 10<sup>7</sup> esporos/g<sub>m</sub>, respectivamente.

A escolha dos novos valores para as variáveis fixas, foi baseada no ensaio 8 do planejamento fracionado (item 4.3.1) conduzido com 3% da borra de girassol, que obteve a maior atividade lipásica dentre todos os experimentos testados (Tabela 14). Quanto a concentração de inóculo, foi utilizado 10<sup>7</sup> esporos/g<sub>m</sub>, que é um padrão adotado e utilizado pela equipe do laboratório de bioprocessamento da Embrapa Agroindústria de Alimentos para o fungo *A. niger* 11T53A14.

Os resultados desse novo planejamento podem ser visualizados na Tabela 33 na qual se encontram os resultados de atividade lipásica e específica aparente. Pôde-se verificar pela tabela que os resultados foram bem próximos aos encontrados no primeiro DCCR (item 5.2.4.1), porém nenhum valor de atividade lipásica e específica aparente foi maior do que o resultado encontrado no planejamento fracionado realizado anteriormente (item 5.2.1), o que indica que a otimização novamente não foi alcançada. Contudo, prosseguiu-se com as análises estatísticas para verificar a influência das variáveis.

Nas Tabelas 34 e 35 estão apresentados os coeficientes de regressão e desvios padrão dos ensaios para a atividade lipásica e específica aparente, respectivamente, para o segundo DCCR no qual foram considerados significativos os parâmetros com p-valor menor que 0,1 ( $p < 0,1$ ). Nas tabelas os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos à letra Q.

**Tabela 33** Atividade lipásica e específica aparente presente no extrato enzimático com a borra de girassol como indutor e referente ao segundo DCCR.

Ensaio	Atividade lipásica (U/g <sub>ms</sub> )	Atividade específica aparente (U/g de proteína)
1DCCR	95,73	1404,63
2DCCR	72,39	1393,03
3DCCR	146,56	2277,55
4DCCR	114,29	2106,47
5DCCR	131,86	2113,79
6DCCR	115,29	1998,57
7DCCR	124,20	2218,42
8DCCR	153,38	2715,88
9DCCR	142,28	2374,42
10DCCR	151,25	2526,88
11DCCR	129,79	2210,65

Através dos dados das Tabelas 34 e 35 pôde-se verificar que somente a variável VSSA (L) apresentou significância a um nível de confiança de 90% para as atividades lipásica e específica aparente. As demais variáveis (concentração de nitrogênio (Q), VSSA (L) e VSSA (Q)) não foram estatisticamente significativas.

A variável VSSA linear exerceu influência positiva sobre as duas respostas analisadas, o que significou que, para aumentar a atividade enzimática seria preciso aumentar o VSSA utilizado, o que seria inviável devido aos altos valores de umidade já aplicados nesse experimento (60,9%, 65%, 75%, 85% e 89,1%) (Tabela 11) uma vez que se trata de fermentação em estado sólido.

**Tabela 34** Coeficiente de regressão e desvio padrão do segundo DCCR para atividade lipásica.

Variáveis	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(4)	p
Médias*	146,90	14,26	10,29	0,0005
(1) Nitrogênio (L)	-9,90	7,14	-1,38	0,2379
Nitrogênio (Q)	-17,73	9,47	-1,87	0,1344
(2) VSSA (L)*	16,78	7,14	2,34	0,0785
VSSA (Q)	-10,07	9,47	-1,06	0,3471
1 L x 2 L	-2,23	9,47	-0,22	0,8356

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)  
VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

**Tabela 35** Coeficiente de regressão e desvio padrão do segundo DCCR para atividade específica aparente.

Variáveis	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(4)	p
Médias*	2453,41	259,41	9,45	0,0007
(1) Nitrogênio (L)	-43,27	129,9	-0,33	0,7557
Nitrogênio (Q)	-316,77	172,24	-1,82	0,1397
(2) VSSA (L)*	286,82	129,9	2,2	0,0918
VSSA (Q)	-110,06	172,24	-0,63	0,5576
1 L x 2 L	-39,87	183,44	-0,21	0,8385

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)  
VSSA = volume de solução de sulfato de amônio

Para verificar a validade dos coeficientes e construção do modelo foi realizada a análise de variância (ANOVA) conforme apresentado nas Tabelas 36 e 37 para a atividade lipásica e específica aparente, respectivamente.

**Tabela 36** Análise de variância da atividade lipásica.

Fonte de variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>
Regressão	2246,96	1	2246,96	4,62
Resíduo	3891,42	8	486,43	
Total	6138,38	9		

$R^2 = 73,48$ ;  $F_{(1;8;0,1)} = 3,46$

**Tabela 37** Análise de variância da atividade específica aparente.

Fonte de variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>
Regressão	656193,5	1	656193,5	5,15
Resíduo	1018380,5	8	127297,6	
Total	1674574	9		

$R^2 = 67,84$ ;  $F_{(1;8;0,1)} = 3,46$

Com os resultados da ANOVA (Tabela 36) verificou-se que o  $F_{\text{calculado}}$  ( $F_{\text{calc}}$ ) para a regressão foi igual a 4,62, valor maior que o  $F_{\text{tabelado}}$  ( $F_{\text{tab}}$ ) 3,46, apenas 1,3 vezes e a porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) pelo modelo foi baixa (73,48%).

Para a atividade aparente os resultados da ANOVA (Tabela 37) mostraram que o  $F_{\text{calc}}$  para a regressão foi igual a 5,15 e apenas 1,5 vezes maior que o  $F_{\text{tab}}$  3,46. A porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) pelo modelo foi mais baixa que para primeira resposta (67,84%).

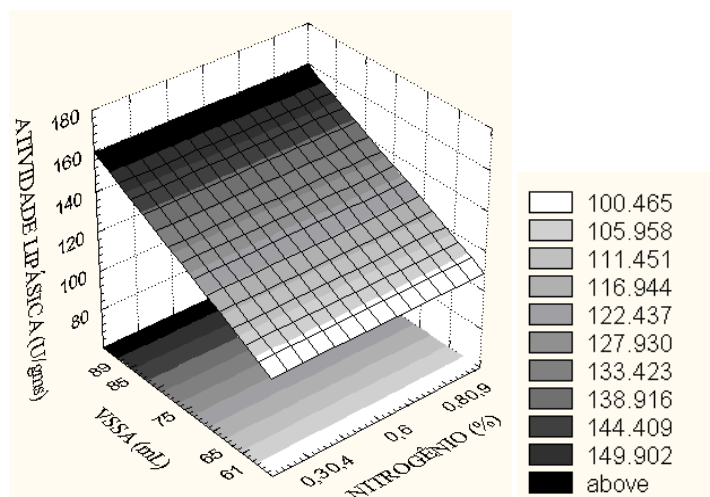
A superfície de resposta e as curvas de contorno para as atividades estudadas apresentam as faixas de nitrogênio e VSSA que possibilitam a escolha dos melhores valores a serem utilizados de acordo com a necessidade e viabilidade do processo para a atividade enzimática.



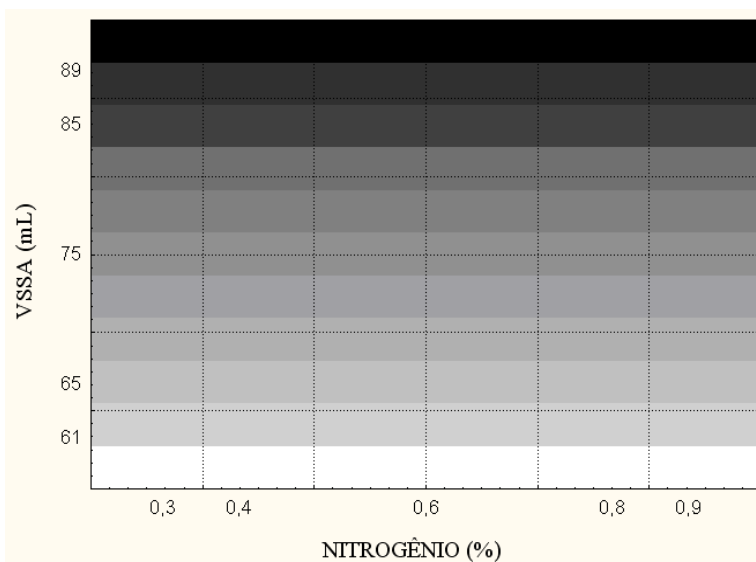
As Figuras 15 e 16 mostram a superfície de resposta e a curva de contorno para a atividade lipásica, respectivamente. Enquanto que, as Figuras 17 e 18 mostram a superfície de resposta e a curva de contorno para a atividade específica aparente, respectivamente. As figuras demonstram um comportamento linear, haja vista que nenhuma variável quadrática foi significativa (Tabelas 34 e 35).

Observa-se pelas figuras que a variável nitrogênio não influenciou na resposta atividade lipásica, como mostrado nas Tabelas 34 e 35. Isso pode ter ocorrido porque a concentração de nitrogênio, adicionada ao meio através da solução de sulfato de amônio, pode ser muito inferior ao teor de nitrogênio presente no farelo de trigo do meio fermentativo. Independente do valor de nitrogênio utilizado, o aumento da atividade só é possível com valores elevados de VSSA.

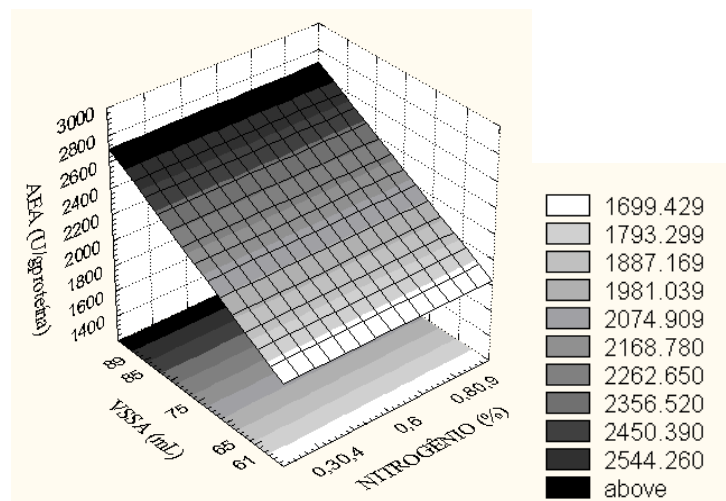
No entanto, a área definida como a que proporciona a maior atividade, possivelmente está acima da faixa estudada sendo necessário deslocar o VSSA para valores maiores, acima de 90 mL.



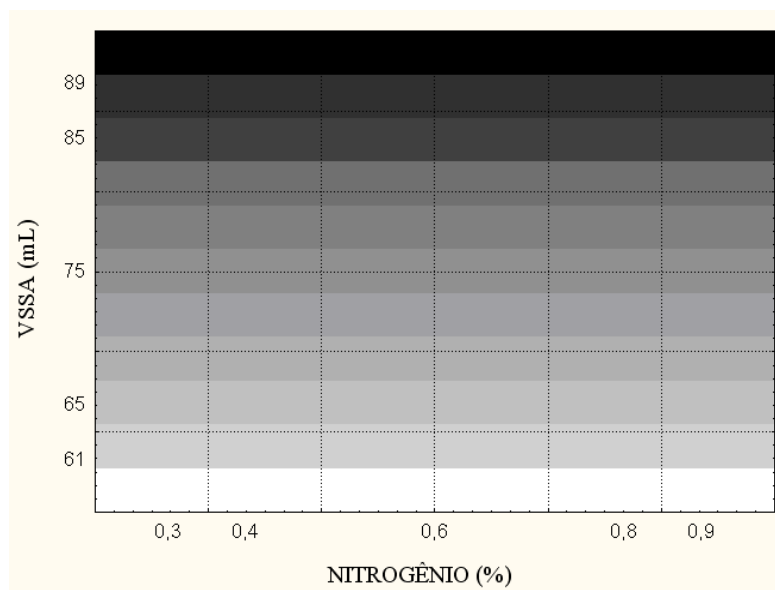
**Figura 15** Superfície de resposta para a atividade lipolítica em função das variáveis VSSA e nitrogênio.



**Figura 16** Curva de contorno para a atividade lipolítica em função das variáveis VSSA e nitrogênio.



**Figura 17** Superfície de resposta para a atividade específica aparente (AEA) em função das variáveis VSSA e nitrogênio.



**Figura 18** Curva de contorno para a atividade específica aparente em função das variáveis VSSA e nitrogênio.

Para obter o aumento dos valores das atividades lipásica e específica, observou-se que seria necessário aumentar o VSSA para valores superiores a 90 mL e por motivos econômicos utilizar a menor concentração de nitrogênio (0,3%). Porém, o processo de FES ocorre em ambiente com quantidade de água restrita e, desta maneira, não seria possível otimizar o processo, pois valores maiores de VSSA provavelmente ocasionariam o *dripping* no substrato, ou seja, aparecimento de água livre.

De acordo com Mahadik et al. (2002), embora o teor de umidade na FES representado pelo VSSA seja fator crucial que determina o sucesso do processo, os níveis de umidade têm grande impacto na propriedade física do substrato sólido. Níveis maiores de umidade que o ideal podem provocar diminuição da porosidade, menor transferência de

oxigênio, e alteração na estrutura das partículas do farelo de trigo. Da mesma forma, menor umidade que a ideal, diminui a solubilidade do substrato sólido e reduz o grau de inchaço.

Mediante os resultados mencionados, torna-se imperioso ressaltar que as limitações encontradas pela FES como controle e monitoramento de parâmetros, tais como temperatura, pH, umidade e aeração; homogeneização do meio de cultura e distribuição do micro-organismo ao longo da coluna do reator dificultaram o processo de otimização da produção, sendo necessário testar novos valores e novas variáveis de processo. Apesar disto, bons resultados de atividade lipásica e específica aparente foram encontrados utilizando os resíduos agroindustriais principalmente a borra de girassol.

## 6 CONCLUSÕES

As condições estudadas permitiram encontrar valores de atividade enzimática significativos quando comparados aos valores encontrados na literatura.

As borras aumentaram a atividade enzimática induzindo a produção da lipase devido a presença de óleo neutro em torno de 20%. Além disso, elas apresentam predominância dos ácidos graxos como oléico, linoléico, palmítico e são compostas pelos íons sódio, fósforo e potássio em maior quantidade.

Dentre as borras analisadas, canola, milho e girassol, a borra de girassol se destacou na maioria dos ensaios experimentais com máximo de atividade de 201,81 U/g<sub>ms</sub> frente a 171,41 U/g<sub>ms</sub> e 183,45 U/g<sub>ms</sub> para a borra de milho e de canola, respectivamente. A predominância do ácido graxo oléico e linoléico e do íon sódio podem ter favorecido o aumento da atividade enzimática utilizando a borra de girassol.

O delineamento fatorial fracionado 2<sup>4-1</sup> utilizando a borra de girassol, indicou as variáveis concentração de inóculo e de nitrogênio e o volume de solução de sulfato de amônio como as variáveis que influenciaram significativamente a atividade enzimática ao nível de significância de 90%, sendo essas selecionadas para a etapa de otimização (DCCR).

Através do resultado da análise do delineamento fatorial 2<sup>3</sup> inferiu-se que a produção da enzima ocorreu independente da presença do substrato lipídico. A atividade enzimática máxima atingida foi de 182,35 U/g<sub>ms</sub>, e em todos os ensaios experimentais foram encontrados valores significativos para uma produção sem o uso de indutor, uma vez que o farelo de trigo apresenta lipídeos em sua composição.

A realização do teste de Tukey comprovou haver diferença significativa ao nível de 95% entre as atividades enzimáticas máximas encontradas no DFF (201,81 U/g<sub>ms</sub>) e DFC (182,35 U/g<sub>ms</sub>), com e sem indutor respectivamente, resultando no aumento da atividade lipásica quando a borra é utilizada. Isso ocorreu porque existe um processo de indução que acontece em presença de fontes lipídicas.

O experimento de otimização, DCCR, foi realizado duas vezes com alterações nos valores das variáveis fixas concentração de indutor e de inóculo, porém não foram obtidos resultados com atividades estatisticamente maiores que os encontrados no delineamento fatorial fracionado, o que impossibilitou encontrar a faixa de ótima de produção da lipase.

As condições estudadas permitiram encontrar valores de atividade enzimática significativos quando comparados aos valores encontrados na literatura.

## **7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Adotar novas faixas de valores de nitrogênio, volume de solução de sulfato de amônio e concentração de indutor, seguido de um novo planejamento experimental;
- Testar outras variáveis de processo relevantes à produção de lipase.

## 8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2010.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (B.CEPPA)**, Curitiba, v. 18, n. 1, jan. - jun., 2000.

ALBERTON, D. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido visando à aplicação no tratamento de efluente de laticínios**. 2009. Tese de Doutorado (Ciências - Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

AMARAL, P. F. F. **Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em Biorreator Multifásico**. 2007. 221 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2007.

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. USA, AOCS, (AOCS Official Method), 2005.

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. USA, AOCS, (AOCS Official Method), 2009.

AZEREDO, L. A. I.; LEITE, S. G. F.; FREIRE, D. M. G.; BENCHETRIT, L. C.; COELHO, R. R. R. Proteases from actinomycetes interfere in solid media plate assays of hyaluronidase activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 207-212, 2001.

BALAJI, V.; EBENEZE, P. Optimization of extracellular lipase production in *Colletotrichum gloeosporioides* by solid state fermentation. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 7, p. 1-8, 2008.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado** Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 2008.

BORBA, R. S.; LOECK, A. E.; BRANCO, J. S. C.; KOPP, M. M.; OLIVEIRA, A. C. Polimorfismo do fungo simbionte de formigas cortadeiras submetido à luz ultravioleta. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1221-1226, 2007.

BOSSOLAN, N. R. S. **Introdução a Microbiologia**. Universidade de São Paulo – Instituto de Física de São Carlos – Licenciatura em Ciências Exatas. Capítulo 3, p. 28-38, 2002.

CANTO, W. L.; MENEZES, T. J. B. **Estudos econômicos – Alimentos Processados, produção, usos e mercado de enzimas.** Campinas, ITAL, n. 29, p. 1-53, 1995.

CARNEIRO, A. F. G. C. **Estabilização de enzimas para modificação de fibras sintéticas.** 2003. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fabricação). Universidade do Minho. Escola de Engenharia, Portugal, 2003.

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

CASTIGLIONI, G. L. **Estudo da produção e utilização de lipase *Burkholderia cepacia* na síntese enzimática do biodiesel: produção de biodiesel via enzimática.** 2009. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo, 2009.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A. Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 181–186, 1999.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA Jr, G. L.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**. v. 4, p. 239-247, 2000.

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

CASTRO, A. M. **Produção e propriedades de celulasas de fungos filamentosos, obtidas a partir de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*).** 2006. 212 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501-505, 1947.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases.** 2006. Tese de Doutorado (Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.

COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 101, p.8308–8314, 2010.

CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Biocatálise: avanços recentes. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 672-675, 2001.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Reviews of Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 314-317, 1995.

COURI, S.; TERZI, S. C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 255–261, 2000.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon source on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 657-663, 2000.

DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 39, p. 676- 681, 2008.

DANTAS, E. M.; AQUINO, L. C. L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 81-87, 2010.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

DHEEMAN, D. S.; FRIAS, J. M.; HENEHAN, G. T. M. Influence of cultivation conditions on the production of a thermostable extracellular lipase from *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, p. 1-17, 2010.

DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1042–1050, 2006.

DOWD, M. K. Compositional Characterization of Cottonseed Soapstocks. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 10, p. 1287-1295, 1996.

DOWD, M. K. Gas chromatographic characterization of soapstock from vegetable oil refining. **Journal of chromatography**, v. 816, p. 185-193, 1998.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, n. 13, p. 113–125, 2003.

DURANT, A. A.; DUMONT, M. J.; NARINE, S. S. In situ silylation for the multicomponent analysis of canola oil by-products by gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 559, p. 227–233, 2006.



DUTRA, J. C. V. **Produção de lipase por *Aspergillus niger* 11T53A14 através de fermentação em estado sólido para a síntese de biodiesel.** 2007. Dissertação (Mestrado Engenharia Química) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

DUTRA, J. C. V.; TERZI, S. C.; BEVILAQUA, J. V.; DAMASO, M. C. T.; COURI, S.; LANGONE, M. A. P.; SENNA, L. F. Lipase production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *A. niger* using digital image processing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 147, p. 63–75, 2008.

EL-BENDARY, M. A. Production of mosquitocidal *Bacillus sphaericus* by solid state fermentation using agricultural wastes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 153–159, 2010.

FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; NETO, V. B.; COURI, S. **Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida.** Embrapa Instrumentação Agropecuária, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, São Carlos: SP, p. 13, 2008.

FERNANDES, M. L. M.; **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise.** 2007. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FOCUS ON CATALYSTS, v.2010, p.2, jan., 2011. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MiamiImageURL&\\_cid=272724&\\_user=687350&\\_pii=S1351418010705146&\\_check=y&\\_origin=search&\\_zone=rslt\\_list\\_item&\\_coverDate=2011-01-31&wchp=dGLbVIVzSkWz&md5=6742c7d91bf69e54bbf86a4dac8b2ddb/1-s2.0-S1351418010705146-main.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=272724&_user=687350&_pii=S1351418010705146&_check=y&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_coverDate=2011-01-31&wchp=dGLbVIVzSkWz&md5=6742c7d91bf69e54bbf86a4dac8b2ddb/1-s2.0-S1351418010705146-main.pdf)>. Acesso em: 21 out. 2011

FOCUS ON CATALYSTS, v. 2010, p.2, nov., 2010a. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MiamiImageURL&\\_cid=272724&\\_user=687350&\\_pii=S135141801070430X&\\_check=y&\\_origin=search&\\_zone=rslt\\_list\\_item&\\_coverDate=2010-11-30&wchp=dGLbVlt-zSkWz&md5=5f0b6d4163d7f01c51e03e7644a47fa6/1-s2.0-S135141801070430X-main.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=272724&_user=687350&_pii=S135141801070430X&_check=y&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_coverDate=2010-11-30&wchp=dGLbVlt-zSkWz&md5=5f0b6d4163d7f01c51e03e7644a47fa6/1-s2.0-S135141801070430X-main.pdf)> Acesso em: 21 out. 2011

FOCUS ON CATALYSTS, v. 2010, p.2, out., 2010b. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MiamiImageURL&\\_cid=272724&\\_user=687350&\\_pii=S1351418010703792&\\_check=y&\\_origin=search&\\_zone=rslt\\_list\\_item&\\_coverDate=2010-10-31&wchp=dGLbVlt-zSkWz&md5=d905503ef52e3bac03c15e5fddd2f9a/1-s2.0-S1351418010703792-main.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=272724&_user=687350&_pii=S1351418010703792&_check=y&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_coverDate=2010-10-31&wchp=dGLbVlt-zSkWz&md5=d905503ef52e3bac03c15e5fddd2f9a/1-s2.0-S1351418010703792-main.pdf)>. Acesso em: 21 out. 2011

FOOD INGREDIENT BRASIL n. 10, p. 40-60, 2009 Disponível em:<<http://www.revista-fi.com/materias/113.pdf>> Acesso em: 10 set. 2011.

FRÉ, N. C. **Obtenção de ácidos graxos a partir da acidulação de borra de neutralização de óleo de soja.** 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

GANDRA, K. M.; DEK BIANCHI, M.; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 182-192, 2008.

GOLDBECK, R. **Triagem, produção e avaliação da atividade da enzima lipase a partir de leveduras silvestres**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos Campinas, São Paulo, 2008.

GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2007.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R., GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1–22, 2008.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; MAUGERIB, F.; RODRIGUES, M. I.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, n. 100, p. 5249–5254, 2009.

GUTARRA, M. L. E.; LIMA, T. M. L.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Influence of inoculum conditions on lipase production by *penicillium simplicissimum* in solid-state fermentation. **2<sup>nd</sup> Mercosur Congress on Chemical Engineering e 4<sup>th</sup> Mercosur Congress on Process Systems Engineering**, 2005.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 474-476, 1973.

HÖLKER, U.; LENZ J. Solid-state fermentation - Are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.

HÖLKER, U; HÖFER, M; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.

ITO, K.; KAWASE, T.; SAMMOTO, H.; GOMI, H.; KARIYAMA, M.; MIYAKE, T. Uniform culture in solid-state fermentation with fungi and its efficient enzyme production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 3, p. 300–305, 2011.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews Microbiology**. v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; KOCH, B. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 332, n. 1/2, p. 143-149, 1993.

JAYAPRAKASH, A.; EBENEZER, P. Investigation on extracellular lipase production by *Aspergillus japonicus* isolated from the paper nest of *Ropalidia marginata*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 2, p.113-117, 2010.

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin- carbohydrate complexes. **Biodegradation**, v. 1, n.2-3, p. 163-176, 1990.

JOHANSEN, S. L.; SIVASOTHY, A.; DOWD, M. K.; REILLY, P. J.; HAMMOND, E. G. Low-molecular weight organic compositions of acid waters from vegetable oil soapstocks. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 10, 1996.

JORGE, N.; SOARES, B. B. P.; LUNARDI, V. M.; MALACRIDA, C. R. Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 947-951, 2005.

KAAIJ, R. V. D. **Alpha-glucan acting enzymes in *Aspergillus niger*: Diversity in enzymatic activities and functions**. University of Groningen, 2007. Dissertação (mestrado). Disponível em: <<http://dissertations.ub.rug.nl/faculties/science/2007/r.v.d.kaaij/>>. Acessado em 10 set. 2011.

KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 505-511, 1998.

KING, W. J.; TAYLOR, S. L.; SNYDER, J. M.; HOLLIDAY, R. L. Total fatty acid analysis of vegetable oil soapstocks by supercritical fluid extraction/reaction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, p. 1291-1295, 1998.

KIRIHATA, J. Líder mundial de bioinovações prepara nova fábrica no Brasil. 19 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.biointernational.com.br/lider-mundial-em-bioinovacoes-prepara-nova-fabrica-no-brasil-19072010/>>. Acesso em: 5 Dez. 2011

KO, W.H.; WANG, I. T.; ANN, P. J. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 37, p. 597–599, 2005.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126–139, 2004.

KUK, M. S.; BALLEW, A. G. The potential of soapstock-derived film: cottonseed and safflower. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 9125, p. 1387-1392, 1999.

KUMAR, R.; MAHAJAN, S.; KUMAR, A.; SINGH, D. Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilus* RK31 using statistical methodology. **New Biotechnology**, v. 28, p. 65-71, n. 1, 2011a.

KUMAR, S.; KATIYAR, N.; INGLE, P.; NEGI, S. Use of evolutionary operation (EVOP) factorial design technique to develop a bioprocess using grease waste as a substrate for lipase production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4090-4912, 2011b.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. 2001. *Biotechnology Industrial*, v. 3. Editora Edgard Blücher, São Paulo.

LIN, E. S.; WANG, C. C.; SUNG, S. C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 98-102, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACEDO, L. N. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; FERREIRA, A. D. F.; DAMASO, M. C. T.; COURI, S. (2009), Estudo da Influência de Variáveis de Processo na Produção de Lipases por Fungo Filamentoso. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal, 6p.

MAG, T. K.; GREEN, D. H.; KWONG, A. T. Continuous Acidulation of soapstock and recovery of acid oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 60, n. 5, 1983.

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

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S.K. Production of protease 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.

MALDONADO, R. R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo, 2006.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, p. 1942-1947, 2008.

MAZUTTI, M. A. **Avaliação cinética e modelagem matemática da produção de inulinase por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo**. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo, 2009.

MENEZES, G. D. G.; OLIVEIRA, A. C. P.; DAMASO, M. C. T.; OLIVEIRA, M. A. C.; COURI, S. Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3t5b8 em fermentação semi- sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica**, v. 25, n. 1, p. 15-27, 2006.

MENEZES, G. D. G., **Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3t5b8 por fermentação semi- sólida em biorreatores de coluna**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Seropédica, Rio de Janeiro, 2006.

MHETRAS, N. C.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1486-1490, 2009.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A.; New developments in solid-state fermentation. II. Rational approaches for bioreactor design and operation. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211–1225, 2000.

MONTESINOS, J. L.; OSBRADORS, N.; GORDILLO, M. A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÀ, C. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, p. 25-37, 1996.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas - Poderosa ferramenta na indústria. **Revista Ciência Hoje**. v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NEI, P.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos. Séries em Biotecnologia**, v. 1. Escola de Química - UFRJ, Rio de Janeiro, 62p. 2008.

OBRADORS, N.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F.; LAFUENTE, F. J.; SOLÀ, C. Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. **Biotechnology Letters**. v. 15, p. 357-360, 1993.

OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; CASTRO, H. F. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 23, n. 5, 2000.

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

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

PAPAGIANNI, M; MOO-YOUNG, M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1271–1278, 2002.

PAPAGIANNI, M.; NOKES, S. E.; FILER, K. Production of phytase by *Aspergillus niger* in

- submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 397–402, 1999.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.
- PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 23, p. 135-140, 2003.
- PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, 2007.
- PESSOA, M. L. A.; ANDRADE, S. A. C.; SALGUEIRO, A. A.; STAMFORD, T. L. M. Aproveitamento de subproduto industrial de óleos vegetais para produção de riboflavina por *candida guilliermondii* DM 644. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 453-458, 2003.
- PEREIRA, C. I.; CRESPO, M. T. B.; ROMÃO, M. V. S. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 211-216, 2001.
- PINTO, G. A. S.; BRITO, E. D.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Comunicado técnico on line – Embrapa**, Fortaleza, 2005.
- POKORNY, D.; FRIEDRICH, J.; CIMERMAN, A.; Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 4, p. 363–366, 1994.
- POLITZER, K.; BON, E. P. S. Enzimas Industriais e Especiais. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ciência, Tecnologia e Inovação, IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, mai. 2006.
- RADZIO, R.; KÜCK, U. Synthesis of biotechnologically relevant heterologous proteins in filamentous fungi. **Process Biochemistry** v. 32, n. 6, p. 529-539, 1997.
- RAMOS, E. Empresa desenvolve enzimas. 28 Jun. 2009. Disponível em:< [http://www.bioenzima.com.br/page\\_4.html](http://www.bioenzima.com.br/page_4.html)>. Acesso em: 5 dez. 2011.
- REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 6, p. 145–150, 2002.
- RIGO, E.; NINOW, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **Food Science and Technology**, n. 43 p. 1132-1137, 2010.

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. 2010. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

RODRIGUEZ, J. A.; MATEOS, J. C.; NUNGARAY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2264-2269, 2006.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126- 131, 2010.

SAKURAI, Y.; LEE, T. H.; SHIOTA, H. On the convenient for glucosamine estimation in koji. **Agriculture Biology Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 619-624, 1977.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 79, p. 66-73, 2011.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. Lipase production: Na insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44, 2012.

SANTOS, R. R. M. **Aproveitamento do caroço do açaí como substrato para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

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

SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; NETO, A. G.; UETANABARO, A. P. T. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, n. 35, p. 91-98, 2006.

SELVAKUMAR, P.; ASHAKUMARY, L.; PANDEY, A. Biosynthesis of glucoamylase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using tea. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 83-85, 1998.

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

SHIRAZI, S. H.; RAHMAN, S. R.; RAHMAN, M. M. Short communication: production of extracellular lipases by *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 595-597, 1998.

SIGMA. **Catálogos Bioquímicos e Reagentes para Pesquisa em Ciências da Vida**. Brasil. 2002.

SILVA, V. C. F.; CONTESINI, F. J.; CARVALHO, P. O. Characterization and catalytic activity of free and immobilized lipase from *Aspergillus niger*: a comparative study. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 8, p. 1468-1474, 2008.

SLIVINSKI, C. T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; TREVISOL, L. R.; CARVALHO, R. D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C. L. M. S. C.; BARONI, S. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 700-705, 2010.

SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 9, 2010.

SUN, S. Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for ‘whole-cell synthetic lipase’ production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 219–224, 2008.

SURESH, B.; VIRUTHAGIRI, T. Optimization and kinetics of pectinase enzyme using *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 8, 2010.

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

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation Biochemical. **Engineering Journal**, n. 13, p.169–179, 2003.

TRIBST, A. A. L. **Efeito do processamento por alta pressão dinâmica combinado com tratamento térmico brando na inativação de *Aspergillus niger* em néctar de manga.** 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo 2008.

VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 175- 178, 2000.

WANG, D.; XU, Y.; SHAN, T. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 30–37, 2008.



WANG, L.; YANG, S. T. 2007 Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources: New Technologies and Applications, Chapter 18: Solid State Fermentation and Its Applications. Editora: Elsevier. p. 465-489.

YADAV, K. N. S.; ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; JADHAV, D. D.; THULASIRAM, H. V. GOKHALE, D. V. Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *yarrowia lipolytica* NCIM 3639. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10663-10670, 2011.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 23, p. 438–450, 1998.

## **ANEXOS**

ANEXO A - Meio de Sabugo de Milho

ANEXO B - Cálculo da Contagem de esporos/g Utilizando a Câmara de Neubauer

ANEXO C - Cálculos para Preparo do Meio de Fermentação

ANEXO D - Cálculo do nitrogênio

ANEXO E - Curva Padrão de Proteína

ANEXO F - Lista dos Reagentes e Produtos e suas Respectivas Marcas

ANEXO G - Lista dos Equipamentos e seus Respectivos Fabricantes

## ANEXO A – Meio de Sabugo de Milho

O meio de sabugo de milho foi utilizado para a produção de conídios que posteriormente são inoculados no meio de fermentação.

O meio é constituído de 4,6 g de sabugo de milho triturado (granulometria  $\leq 4$  mm) enriquecido com 6 mL da solução C. Em seguida, o meio foi esterilizado a 121°C por período de 1 h.

- Solução C

Em balão volumétrico de 50 mL: 2,8 g de peptona + 1 gota de HCl 2 N + 190  $\mu$ L de solução A (Tabela), + 250  $\mu$ L de solução B (Tabela), avolumado com água destilada.

Solução A: Preparo de 100 mL	Solução B: Preparo de 100 mL
<ul style="list-style-type: none"><li>• <math>\text{KH}_2\text{PO}_4 = 420</math> g</li><li>• <math>\text{H}_2\text{O}</math> destilada</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <math>\text{ZnSO}_4 = 3,96</math> g</li><li>• <math>\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 4,60</math> g</li><li>• <math>\text{MnSO}_4 = 0,01</math> g</li><li>• <math>\text{H}_2\text{SO}_4</math> (95-97%) = 0,5 mL</li><li>• <math>\text{H}_2\text{O}</math> destilada</li></ul>

## **ANEXO B - Cálculo da Contagem de esporos/g Utilizando a Câmara de Neubauer**

Considerando-se que a câmara de Neubauer contém 25 quadrículos. Entre a câmara e a lamínula, forma-se um filme líquido da diluição preparada de 0,1 mm de espessura. A dimensão de cada quadrículo é de 0,2 mm x 0,2 mm, portanto o volume de cada quadrículo é de  $4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ , que multiplicado pelo número total de quadrículos (25) é igual a  $10^{-4} \text{ cm}^3$ .

$$C = \frac{\text{n}^\circ \text{ de esporos} * D * 25 * 10^4}{5}$$

Onde:

C= concentração de esporos/ mL

D= diluição.

nº de esporos = quantidade de esporos contados.

$$V = \frac{m * \text{Esporos}}{C}$$

Onde:

C= Concentração de esporos.

Esporos = esporos/g de meio a ser inoculado.

V= volume de extrato enzimático a ser inoculado.

## ANEXO C - Cálculos para Preparo do Meio de Fermentação

a)  $40 \text{ g meio} \text{-----} 100\%$

$x \text{-----} \% \text{ umidade (meio inoculado)}$

$x = \text{g meio úmido}$

b)  $40 - x = W \text{ g meio seco}$

c)  $U/\text{mL (atividade)} \text{-----} 1 \text{ mL}$

$y \text{-----} 100 \text{ mL}$

$y = U \text{ em } 100 \text{ mL de tampão (que são usados para } 40 \text{ g de meio)}$

d)  $Y \text{-----} W \text{ g}$

$Z \text{-----} 1 \text{ g}$

$Z = U/\text{g massa seca}$

## ANEXO – D – Cálculo do nitrogênio

Ao adicionar um determinado volume de sulfato de amônio ao meio de fermentação farelo de trigo, foi ao mesmo tempo analisado 2 variáveis: umidade e nitrogênio. Os valores de nitrogênio testados foram baseados em trabalhos da literatura e a quantidade de sulfato de amônio utilizado para preparar a solução com água foi determinado através do cálculo abaixo:

$$Y \cdot V = W \cdot X$$

$$132 \cdot X = 28 \cdot M$$

Onde: Y= quantidade (g) de nitrogênio desejado no total de meio preparado.

V= volume do balão volumétrico que será avolumada a solução

W= volume de solução a ser adicionado ao meio de fermentação

X = massa (g) de nitrogênio

132= massa molar do sulfato de amônio utilizado como fonte de nitrogênio

28= massa de nitrogênio presente na massa molar do sulfato de amônio

M= massa de sulfato de amônio que será pesada e avolumada

## ANEXO E - Curva Padrão de Proteína

Preparo de soluções para curva padrão de proteína (método de Lowry) utilizando SBA

Solução mãe (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (mg/L)
10	90	10
20	80	20
30	70	30
40	60	40
50	50	50
60	40	60
70	30	70
80	20	80
90	10	90

## ANEXO F - Lista dos Reagentes e Produtos e suas Respectivas Marcas

Reagentes e produtos	Marca
Acetona	Isofar
Ácido acético	Merck
Ácido cítrico	Grupo química
Ácido clorídrico	Isofar
Ácido sulfúrico	Vetec
Ácido tricloracético	Carlo Erba Reagenti
Ágar-ágar	Isofar
Azocaseína	Sigma
Biftalato de potássio (KOH)	Isofar
Carbonato de sódio	Isofar
Citrato de sódio	Merck
Cloreto de potássio (KCl)	Vetec
Clorofórmio	Vetec
Etanol	Vetec
Éter etílico	Tedia
Éter de petróleo	Tedia
Fosfato de potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Vetec
Fosfato de sódio dibásico (NaHPO <sub>4</sub> )	Merck
Fosfato de sódio monobásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Fosfato dibásico de potássio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Grupo Química
Goma arábica	Vetec
Hidróxido de potássio (KOH)	Reagen
Hidróxido de sódio (NaOH)	Merck
Membrana de microfiltração (0,45 µm)	Sartorius Stedim biotech- GmbH
Metanol	Tedia
Nitrato de sódio (NaNO <sub>3</sub> )	Reagen
Papel de filtro	Quanty
Óleo de oliva	Borges
Soro Albumina (BSA)	Sigma
Sulfato de amônio (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Vetec



Sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ )	Reagen
Sulfato de manganês ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ )	Reagen
Sulfato de sódio anidro	Merck
Sulfato de zinco ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )	Reagen
Sulfato ferroso ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	Baker Chemical
Twen 80	Reagen
Tampão pH 4,0;7,0 e 10,0	Dinâmica-química contemporânea

### ANEXO G - Lista dos Equipamentos e seus Respectivos Fabricantes

<b>Equipamentos</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>
Autoclave	Primatec	-
Balança analítica	Mettler	AT 201
Balança Semi analítica	Sartorius universal	
Banho Maria com agitação	Precision Scientific Carl	-
BOD	Fanem	347 CDG
Bomba de vácuo	Solab	
Cabine de controle biológico	Nuaire	425-200
Câmara de Neubauer	Boeco Germany	-
Capela	Scientech	-
Centrífuga	Sorvall	-
Cromatógrafo gasoso	Agilent Technologies	6890 N
Espectrofotômetro	Biospectro	SP-220
Estufa para umidade	Ética	-
Karl Fisher	Metrohm	Titrimo plus 870
Microscópio	Zeiss Jena	-
Mix	Philips Walita	-
Potenciômetro	Analyser	pH 300M
Titulador automático	Metrohm	794 basic titrimo