

URI - CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO
SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES
MICROBIANAS**

DANIELA DOS SANTOS DE OLIVEIRA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Campus de Erechim.

Orientadores: Helen Treichel
Débora de Oliveira

ERECHIM, RS – BRASIL
SETEMBRO/2011

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS

DANIELA DOS SANTOS DE OLIVEIRA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI – Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Profª Débora de Oliveira, D. Sc.

Orientador

Profª Helen Treichel, D. Sc.

Orientador

Banca Examinadora:

Prof. Altemir Mossi, D. Sc.

Prof^a Giovana C. Ceni, D. Sc.

Prof^a Clarissa Dalla Rosa, D. Sc.

Prof^a Telma Elita Bertolin, D. Sc.

Erechim, setembro de 2011

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA
TESE DE DOUTORADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM
OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA
BIBLIOTECA

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade concedida para que eu possa adquirir novos conhecimentos e também evoluir como ser humano.

Aos amores da minha vida: Emanuelle e Pedro, meus filhos, com eles aprendi o verdadeiro significado da palavra amor incondicional, obrigada pela paciência e olhar inocente cada vez que a mamãe chora... E ao meu esposo, Márcio, que entendeu todos os finais de semana que eu tinha que “titular”, por apoiar minhas decisões, por ouvir minhas ansiedades e pelo amor que nos une.

Aos meus pais (Edison e Elaine) por me amarem acima de tudo e por terem sempre alguma palavra de apoio e encorajamento e aos meus irmãos (Le e Mano), mesmo estando longe estamos sempre muito perto.

Às minhas orientadoras, Helen e Débora, pela paciência durante a minha gravidez, amizade, pelos conselhos e pelas reuniões muito proveitosas. São profissionais exemplares pela competência e dedicação à arte de ensinar e pesquisar.

Aos meus bolsistas Aline e Verlindo (braço direito e braço esquerdo), sem eles, com certeza este trabalho não teria sido concluído.

À família Ceni (sogro, sogra, tia Jô, tia Andrea), obrigada por me tirarem dos apertos com a “filharada”.

Aos amigos Tia Helen e Tio Altemir, pelos conselhos, “jantinhas”, conversas e pelo carinho com meus filhos.

À amiga Lenir, pelas conversas, por me induzir a estudar, aos preparos de trabalho e artigos, pois estudamos muito para tirar “A”.

Às amigas Marceli e Ise que me ensinaram tudo sobre esterificação e que germinadora não é geladeira. Elas sempre me incentivaram com palavras de encorajamento “Dani, vai dar tudo certo”... Obrigada.

À dupla Jonaina e Jamile, à amiga Vivi (pelas conversas e fornecimento de leite), às amigas Aline Richetti, Simone, Silvana, Stefanni, Sheila, todas de uma forma e outra sempre tiveram muita paciência em me ajudar.

Aos amigos (Imlau e Elisa) e companheiros de ida e vinda do Instituto Federal de Sertão, por me aguentarem falando da tese durante as nossas viagens. A todos os colegas de trabalho que estão sempre prontos a me ajudar.

Aos professores Marco Di Luccio, Geciane e Eunice, por contribuírem com meu aprendizado em uma área tão diferente de minha formação, sempre dispostos em ensinar e responder minhas dúvidas.

E, por fim, mas de uma importância muito relevante, à Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (Uri- Campus Erechim), pela oportunidade em realizar o doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

RESUMO

A tecnologia enzimática e a biocatálise são ferramentas promissoras para síntese de compostos de alto valor agregado. Dentre as principais enzimas utilizadas em biocatálise destacam-se as lipases, pois apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é restrito. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos e sua quimio, regio e enantiosseletividade. O presente trabalho teve como objetivo geral estudar a otimização do meio de produção de lipase em fermentação em estado sólido por micro-organismos (fungo filamentoso *Penicillium crustosum* e levedura *Sporobolomyces ruberrimus*) em diferentes substratos visando à utilização de resíduos agroindustriais para se obter um processo mais econômico e viável; a escolha do melhor suplemento, e a caracterização química para após realizar a aplicação em reações de síntese. O aspecto conjunto de produção de enzimas por Fermentação em Estado Sólido (FES) com aproveitamento de resíduos e a geração de produtos de alto valor agregado, justificam plenamente este trabalho, considerando o aumento dos volumes de resíduos agroindustriais gerados nas indústrias, associado à crescente preocupação com os impactos ambientais destes e uma legislação ambiental cada vez mais rígida. O fungo filamentoso *Penicillium crustosum*: mostrou-se um micro-organismo promissor para produção de lipases utilizando resíduos agroindustriais como substrato. A condição otimizada, de acordo com as variáveis avaliadas, 60 % de umidade e temperatura de 30 °C, conduziu a atividades de esterificação máximas de 116,30 U/g (farelo de soja-FS); 136,16 U/g (farelo arroz-FA); 192,93 U/g (farelo do caroço de algodão-FCA) e para bagaço de cana (BC) de 107,96U/g, em 48 horas de fermentação. A partir desses resultados avaliou-se o efeito da suplementação dos farelos de soja e de arroz para se atingir a maximização da produção de lipase. Através da técnica de planejamento sequencial de experimentos foi possível otimizar o processo em termos de atividade de esterificação para cada substrato testado: 1,5 % (p/p) de azeite de oliva (AO) e 5,5 % (p/p) de uréia no farelo de soja e 5,5 % (p/p) de água de maceração de milho (AMM) no farelo de arroz. Observou-se que na caracterização enzimática parcial do extrato bruto o emprego do ácido butírico e do ácido oleico como doadores de acila reagindo com metanol como álcool, resultou nas maiores atividades lipásicas, com um pico de atividade de 604,95 U/g e de 567,19 U/g para a enzima produzida

utilizando FS e de 592,65 U/g e 562,13 U/g para a enzima produzida quando se utilizou FA como substrato, respectivamente; tanto os extratos enzimáticos do FS quanto do FA mostraram maior estabilidade em termos de atividade de esterificação (U/g) em temperaturas de 35 °C. Os extratos enzimáticos do FS e do FA mostraram estabilidade durante 30 dias em temperatura de refrigeração e 20 dias em temperatura de congelamento; os dois substratos testados mostraram melhores atividades em temperaturas baixas (11,8 °C) e pH em torno de 6,5, tendendo para alcalinidade. Já na caracterização enzimática parcial do extrato precipitado foi possível observar que o emprego do ácido oleico como doador de acila reagindo com etanol como álcool, resultou nas maiores atividades lipásicas, com um pico de atividade de 105,15 U/g para a enzima produzida utilizando FA e para a enzima produzida quando se utilizou FS como substrato a maior atividade de esterificação foi 84,12 U/g quando houve a reação do ácido oléico com o álcool propan-1-ol; tanto os extratos enzimáticos do FS quanto do FA mostraram maior estabilidade em termos de atividade de esterificação (U/g) em temperaturas de 35 °C; os extratos enzimáticos do FS e do FA mostraram maior estabilidade em temperaturas de congelador e refrigeração. Os extratos precipitados apresentaram pico de atividade de esterificação (U/g) em temperaturas mais altas e memória de pH mais ácidos. Os resultados encontrados para a produção de lipases a partir da levedura *Sporobolomyces ruberrimus* foram de 134,5 U/g (FS), 169,33 U/g (BC) e de 202,45 U/g (FA) A utilização dos resíduos agroindustriais como fontes alternativas de substratos para produção de enzimas podem auxiliar na redução da poluição ambiental, além de reduzir o custo global de produção de enzimas microbianas, levando em conta que o Brasil é um país rico, em se tratando destes resíduos, o que justifica a investigação dos mesmos na obtenção de produtos de alto valor agregado.

PALAVRAS-CHAVE: Lipases, *P. crustosum*, *S. ruberrimus*, resíduos agroindustriais

ABSTRACT

The enzymatic technology and the biocatalysis are promising tools for the synthesis of high value compounds. Among the major enzymes used in biocatalysis, stand out the lipases, as they present ability to catalyze reactions both in aqueous and organic media. Moreover, the high potential of application of lipases is based on their ability of using a wide range of substrates, their stability to temperature, pH and organic solvents and their chemio, regio and enantioselectivity. The main objective of this work was to evaluate the optimization of medium for the production of lipase by solid state fermentation (SSF) using *Penicillium crustosum* (filamentous fungi) and *Sporobolomyces ruberrimus* (yeast) in several substrates aiming at the use of agroindustrial residues to obtain an economical and viable process, the choice for the most adequate supplement and the chemical characterization of the enzymatic extract obtained for further application as catalyst in reactions of synthesis. The production of enzymes by SSF by the use of residues and the achievement of high value products justifies this work, considering the increase of volume of agroindustrial residues generated by the industries, associated to the growing concerns about environmental impacts and the stricter legislation. The fungi *Penicillium crustosum* showed a promising potential for lipases production using agroindustrial residues as substrate. The optimized condition, following the evaluated variables, was 60 % of water content and 30 °C, giving maximal esterification activities of 116.30 U/g (soybean bran); 136.16 U/g (rice meal); 192.93 U/g (cottonseed meal) and for sugarcane bagasse activities of 107.96 U/g, after 48 hours of fermentation. From these results, the effect of supplementation was evaluated to maximize the lipases production. By means the sequential experimental design technique it was possible to optimize the process in terms of esterification activity for each used substrates: 1.5 wt% of olive oil and 5.5 wt% of urea using soybean bran as substrate and 5.5 wt% of corn steep liquor using rice meal as substrate. The use of butyric and oleic acids as acyl donator and methanol, resulted in higher lipase activities, 604.95 U/g and 567.19 U/g for the lipase produced using soybean bran as substrate and 592.65 U/g and 562.13 U/g for the extract produced by rice meal. Both extracts showed higher stability at temperatures of 35 °C. These extracts showed stability during 30 days under temperature of refrigeration and 20 days at freezing temperature. These two crude enzymatic extracts showed higher activities at low temperatures (11.8 °C) and pH of about 6.5. The partial characterization of the precipitated enzymatic extract showed higher esterification activities when oleic acid

and ethanol were used as substrates, resulting in activities of 105.15 U/g for the enzyme produced by rice meal and of 84.12 U/g for soybean bran, using oleic acid and propan-1-ol as substrates. Both extract were more stable at 35 °C and also showed stability at temperatures of freezer and refrigerator. The concentrated extracts presented peaks of esterification activity (U/g) at higher temperatures and lower pH memories. The results for the production of lipases by the yeast *Sporobolomyces ruberrimus* were of 134.5 U/g (soybean bran as substrate), 169.33 U/g (sugarcane bagasse) and 202.45 U/g (rice meal) The use of agroindustrial residues as alternative sources of substrates for enzymes production can help the reduction of environmental pollution, and also contribute to reduce the global cost of microbial enzymes, taking into account the high volumes of residues produced in Brazil, fact that justifies the investigation of use for the production of high value compounds.

KEYWORDS: Lipases, *P. crustosum*, *S. ruberrimus*, agroindustrial residues.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	LIPASES	5
2.2	PRODUÇÃO DE LIPASES	6
2.3	CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES.....	18
2.4	PRÉ-PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	20
2.5	APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE LIPASES	21
2.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	MATERIAL	24
3.2	EQUIPAMENTOS	25
3.3	MÉTODOS	26
3.4	MICRO-ORGANISMOS	27
3.5	SUBSTRATOS.....	29
3.6	CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS E DOS SUPLEMENTOS	30
3.7	ESTUDO DA PRODUÇÃO DA LIPASE	33
3.8	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ESTERIFICAÇÃO ..	39
3.9	CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO PRECIPITADO OBTIDO A PARTIR DO FUNGO FILAMENTOSO <i>P. crustosum</i>	40
3.10	CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO E CONCENTRADO OBTIDOS A PARTIR DO FUNGO <i>P. crustosum</i>	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS	44
4.2	PRODUÇÃO DE LIPASE EM FES OBTIDAS PELO FUNGO FILAMENTOSO <i>P. crustosum</i> , CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO PRECIPITADO	47
4.3	PRODUÇÃO DE LIPASES OBTIDAS POR FES UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATOS A PARTIR DA LEVEDURA <i>S. ruberrimus</i>	91
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	99
5.1	FUNGO FILAMENTOSO <i>PENICILLIUM CRUSTOSUM</i>	99
5.2	LEVEDURA <i>SPOROBOLOMYCES RUBERRIMUS</i>	101
5.3	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	102
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

7	ANEXO.....	119
7.1	Production and partial characterization of multifunctional lipases by <i>Sporobolomyces ruberrimus</i> under solid state fermentation using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates.....	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Aspecto do fungo <i>Penicillium crustosum</i> semeado em meio PDA.	28
Figura 2- Avaliação da produção de lipase ao longo de 5 dias de fermentação a 27 °C e umidade 55 %, usando como substratos farelo de algodão, farelo de arroz e farelo de soja e resposta em termos de atividade de esterificação do extrato enzimático bruto.....	47
Figura 3- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de esterificação em 48 horas de fermentação utilizando farelo de soja como substrato e azeite de oliva e uréia como suplementos.....	60
Figura 4- Especificidade do extrato enzimático (farelo de soja e de arroz) da reação do ácido butírico em diferentes alcoóis.	65
Figura 5- Especificidade do extrato enzimático (farelo de soja e de arroz) da reação do ácido oleico em diferentes alcoóis.....	66
Figura 6- Especificidade do extrato enzimático (farelo de soja e de arroz) da reação do ácido laurico em diferentes alcoóis.	67
Figura 7- Estabilidade termica do extrato enzimático bruto a 35 °C.....	69
Figura 8- Estabilidade termica do extrato enzimático bruto a 45 °C.....	69
Figura 9- Estabilidade termica do extrato enzimático bruto a 60 °C.....	70
Figura 10- Atividades lipásicas relativas (%) das enzimas ao longo do período de armazenamento em refrigeração (4 °C).	72
Figura 11- Atividades lipásicas relativas (%) das enzimas ao longo do período de armazenamento em congelador (-10 °C).	73
Figura 12- Atividades lipásicas relativas (%) das enzimas ao longo do período de armazenamento em temperatura ambiente.	73
Figura 13- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a avaliação do comportamento da lipase produzida em diferentes temperaturas e memórias de pH para o substrato FA.....	78
Figura 14- Especificidade do extrato enzimático precipitado(farelo de soja e de arroz) da reação do ácido oleico em diferentes álcoois.	82
Figura 15- Especificidade do extrato enzimático precipitado (farelo de soja e de arroz) da reação do ácido butírico em diferentes álcoois.....	82
Figura 16- Estabilidade térmica do extrato enzimático precipitado a 35 °C.	83
Figura 17- Estabilidade térmica do extrato enzimático precipitado a 45 °C.	84

Figura 18- Estabilidade térmica do extrato enzimático precipitado a 60 °C.	85
Figura 19- Atividades lipásicas relativas (%) das enzimas ao longo do período de armazenamento em refrigeração (4 °C).	86
Figura 20- Atividades lipásicas relativas (%) das enzimas ao longo do período de armazenamento congelador (-10 °C).	87
Figura 21- Atividades lipásicas relativas (%) das enzimas ao longo do período de armazenamento em temperatura ambiente.	87
Figura 22- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de esterificação em 48 horas de fermentação e utilizando farelo de soja como substrato.	95
Figura 23- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de esterificação em 48 horas de fermentação e utilizando farelo de arroz como substrato.	95
Figura 24- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de esterificação em 72 horas de fermentação e utilizando bagaço de cana como substrato.	96

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Principais micro-organismos produtores de lipases em FS e FES	8
Tabela 2-Substratos e micro-organismos utilizados em processo de fermentação em estado sólido	13
Tabela 3- Fatores físicos que podem afetar o processo de fermentação em estado sólido	16
Tabela 4-Fatores físico-químicos e bioquímicos que podem afetar o processo de fermentação em estado sólido	17
Tabela 5- Principais aplicações de lipases em diferentes segmentos	22
Tabela 6- Variáveis e níveis estudados no primeiro planejamento fatorial completo para cada substrato e para o fungo filamentoso <i>P. crustosum</i> e a levedura <i>S. ruberrimus</i> em 48 h de fermentação.....	36
Tabela 7-Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental PB para avaliação do efeito da suplementação dos substratos farelo de soja e farelo de arroz utilizados para produção de enzimas obtidas pelo fungo filamentoso <i>P. crustosum</i>	37
Tabela 8-Variável e níveis estudados no planejamento DCCR para otimização da produção da lipase utilizando farelo de soja como substrato e o fungo filamentoso <i>P. crustosum</i>	38
Tabela 9-Variável e níveis estudados nos planejamento DCCR para otimização da produção da lipase utilizando farelo de arroz como substrato eo fungo filamentoso <i>P. crustosum</i>	38
Tabela 10- Variáveis e níveis estudados no planejamento DCCR para o processo de precipitação da lipase utilizando farelo de soja e de arroz como substrato e o fungo filamentoso <i>P. crustosum</i>	41
Tabela 11- Variáveis e níveis inestigados na avaliação do efeito temperatura e da memória de pH na atividade enzimática de esterificação.....	43
Tabela 12- Caracterização química dos substratos utilizados na FES para produção de lipases	45
Tabela 13- Caracterização química dos suplementos utilizados para produção de lípases obtidas a partir do <i>P. crustosum</i> em FES de farelo de soja e de arroz	45
Tabela 14- Matriz do DCCR 2 ² com valores reais e codificados e as respostas da atividade de esterificação com <i>P. crustosum</i> em 48 h de FES para cada um dos substratos testados	49

Tabela 15- Matriz do DCCR 2 ² (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de esterificação com <i>P. crustosum</i> em 72 h de FES	50
Tabela 16- Matriz do planejamento experimental Placket-Burman com valores reais e codificados das variáveis e as respostas de atividade de esterificação em 48 h com diferentes suplementos no farelo de soja.....	52
Tabela 17- Efeito das variáveis de processo estudadas no planejamento experimental Plackett- Burman (PB) na produção de lipase após 48 h de fermentação no farelo de soja.....	53
Tabela 18- Matriz do planejamento experimental Placket-Barman com valores reais e codificados das variáveis e as respostas de atividade de esterificação em 48 h com diferentes suplementos no farelo de arroz	55
Tabela 19- Efeito das variáveis de processo, estudadas no planejamento experimental Plackett- Burman (PB) na produção de lipase após 48h de fermentação no farelo de arroz.....	56
Tabela 20- Matriz do DCCR 2 ² (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de esterificação com <i>P. crustosum</i> e farelo de soja em 48 h.....	58
Tabela 21- Coeficientes de regressão para a produção de lipase após 48h de FES utilizando farelo de soja como substrato e diferentes suplementos.....	58
Tabela 22- Análise de variância para atividade lipásica no tempo de 48h utilizando FS como substrato.....	59
Tabela 23- Matriz do DCCR 2 ³ (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de esterificação com <i>P. crustosum</i> e farelo de arroz em 48h.....	61
Tabela 24- Coeficientes de regressão para a produção de lipase após 48 h de FES utilizando farelo de arroz como substrato e diferentes suplementos.....	62
Tabela 25- Análise de variância para atividade lipásica no tempo de 48 h utilizando FA como substrato e diferentes suplementos	63
Tabela 26- Suplementação do farelo de arroz com AMM com triplicata do ponto central	63
Tabela 27- Matriz do delineamento experimental (valores reais e codificados) e a resposta em termos de atividade de esterificação avaliando temperatura e memória de pH.....	75
Tabela 28- Coeficientes de regressão para atividade de esterificaçã (U/g) do farelo de soja em diferentes T ^a e memória de pH.....	76

Tabela 29- Coeficientes de regressão para atividade de esterificação (U/g) do farelo de arroz em diferentes Temperatura (°C) e memórias de pH	76
Tabela 30- Análise de variância para a avaliação da significância estatística dos modelos propostos para a atividade de esterificação (U/g) das enzimas do farelo de arroz..	77
Tabela 31- Níveis de saturação com sulfato de amônio e do extrato bruto e atividades de esterificação para o farelo de soja e farelo de arroz em 48 horas de fermentação	80
Tabela 32- Matriz do delineamento experimental (valores reais e codificados) e a resposta em termos de atividade de esterificação avaliando temperatura e memória de pH dos extratos precipitados FS e FA	89
Tabela 33- Coeficientes de regressão para atividade de esterificação (U/g) dos extratos precipitados do farelo de soja e de arroz	90
Tabela 34- Matriz dos DCCR (valores codificados e reais com as respostas em termos de atividade lipásica) para avaliação dos diferentes substratos, após 48 horas de fermentação para FS e FA e 72 horas de fermentação para BC	92
Tabela 35- Análise de variância para atividade lipásica no tempo de 48 h utilizando FS	94
Tabela 36- Análise de variância para atividade lipásica no tempo de 48 h utilizando FA	94

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática e a biocatálise são ferramentas promissoras para a síntese de compostos de interesse industrial. Dentre as principais enzimas utilizadas em biocatálise destacam-se as lipases, pois apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é restrito. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização em uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos e sua quimio, regio e enantiosseletividade (Hasan *et al.*, 2006, Krieger *et al.*, 2004).

As lipases catalisam uma série de reações, incluindo a hidrólise, interesterificação, alcoólise, acidólise e esterificação. Diante disto, as lipases, especialmente as microbianas, possuem muitas aplicações industriais. Depois das proteases e carboidrases, as lipases são consideradas como o terceiro maior grupo com base no volume total de vendas. Numerosas espécies de bactérias, bolores e leveduras foram encontradas como micro-organismos potenciais para a produção de lipases (Liu *et al.*, 2008).

Há um amplo campo de aplicações industriais para lipases, que vem se expandindo nas últimas décadas. Por outro lado, percebe-se uma tendência atual de estudar os processos biotecnológicos de uma forma mais ampla, tentando interrelacionar estratégias e procedimentos adequados, desde as etapas de otimização da produção até a aplicação final da enzima, com o principal intuito de reduzir custos e melhorar a qualidade final do produto (Maldonado *et al.*, 2006).

A fermentação em estado sólido (FES) tem se mostrado como uma alternativa na produção de enzimas microbianas, devido à possibilidade de utilização de resíduos e subprodutos da agroindústria como fonte de nutrientes e suporte para o desenvolvimento do micro-organismo (Castilho *et al.*, 2000; Soccol e Vandenberghe, 2003; Pandey, 2003).

A utilização de co-produtos agroindustriais como matérias-primas na produção de lipases, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado, pode vir a reduzir em muito o preço final da enzima, sendo que a aplicação da fermentação em estado sólido em muitos casos diminui consideravelmente os custos do processo, quando comparada à fermentação submersa (Castilho *et al.*, 2000).

A caracterização dos biocatalisadores produzidos com a determinação dos parâmetros tanto do extrato enzimático bruto como do purificado possibilita a indicação de enzimas nativas em processos catalíticos industriais.

Com base no texto descrito anteriormente, o presente trabalho teve como objetivo geral estudar a otimização e caracterização do meio de produção de lipase em fermentação em estado sólido por micro-organismos (fungo filamentoso *Penicillium crustosum* e a levedura *Sporobolomyces ruberrimus*) em diferentes substratos visando à utilização de resíduos agroindustriais para se obter um processo mais econômico e viável. O aspecto conjunto de produção de enzimas por FES com aproveitamento de resíduos e a geração de produtos de alto valor agregado, justificam plenamente este trabalho, considerando o aumento dos volumes de resíduos agroindustriais gerados nas indústrias, associado à crescente preocupação com os impactos ambientais destes e uma legislação ambiental cada vez mais rígida.

Os seguintes objetivos específicos foram delineados a partir do objetivo geral:

- Estudos preliminares de produção de lipases através da fermentação em estado sólido (FES) utilizando micro-organismos e resíduos agroindustriais como substratos;
- Avaliação das condições de fermentação (temperatura e umidade) visando a otimização do processo;
- Estudo da suplementação dos substratos (farelo de soja e de arroz) para se atingir a maximização da produção de lipases fúngicas em termos de atividade de esterificação;
- Concentração do extrato enzimático produzido anteriormente por precipitação com sulfato de amônio a 60%.
- Caracterização parcial dos extratos enzimáticos bruto e concentrado em termos de temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e especificidade frente a diferentes substratos de esterificação.

Este trabalho está dividido em capítulos, onde os Capítulos 1, 2 e 3 apresentam a introdução do trabalho, a revisão bibliográfica e a descrição das metodologias utilizadas na execução dos experimentos, respectivamente. Os resultados foram descritos e discutidos no Capítulo 4 para o fungo filamentoso *Penicillium crustosum* e para a levedura *Sporobolomyces ruberrimus*. No Capítulo 5 estão apresentadas as conclusões obtidas após a realização dos experimentos, incluindo as sugestões para trabalhos futuros relacionados à produção de lipases microbianas. No Capítulo 6 são apresentadas as principais referências bibliográficas consultadas para o embasamento e fundamentação deste trabalho. Em anexo (Capítulo 7) o artigo “Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* under solid state fermentation using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates”.

CAPÍTULO 2

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Enzimas são um grupo de substâncias orgânicas de natureza normalmente protéica com atividade intra ou extracelular, as quais possuem funções catalisadoras de reações químicas que, sem a sua presença, dificilmente aconteceriam. Isso é conseguido através da redução da energia de ativação necessária para que se dê uma reação química, resultando no aumento da velocidade da reação e possibilitando o metabolismo dos seres vivos. Os catalisadores biológicos são extremamente eficientes e muito específicos nas suas funções, o que evita resultados indesejáveis. Desta forma, o caminho para novas aplicações das enzimas está aberto nos mais variados tipos de indústria (Treichel *et al.*, 2010).

Enzimas lipolíticas, como lipases e esterases, constituem um importante grupo de enzimas associadas com o metabolismo de degradação de lipídios. Os micro-organismos produtores de lipases podem ser encontrados no solo e em diversos resíduos oleosos. Os aspectos biológicos, fisiológicos e de aplicação industrial das lipases vêm sendo bastante estudados devido à sua ação sobre substratos insolúveis em água (Treichel *et al.*, 2010).

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol a diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres, apresentando capacidade única de agir na interface óleo/água. Já as esterases são as enzimas que agem em ésteres solúveis em água ou que hidrolisam outros lipídios (Carvalho *et al.*, 2003).

Entretanto, a diferenciação entre lipases e esterases ainda não está completamente definida. Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética, que é a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídio/água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

Com base nestes aspectos, este capítulo tem por finalidade reunir informações relevantes sobre a produção de lipases, especificamente por fermentação em estado sólido,

caracterização bioquímica da enzima e aplicações industriais, através da análise de trabalhos publicados nos últimos anos.

2.1 LIPASES

As lipases (E.C.3.1.1.3) são glicerol éster hidrolases capazes de hidrolisar triacilgliceróis (principais componentes de óleos e gorduras) liberando ácidos graxos livres, glicerol, mono e diacilgliceróis, atuando na interface óleo/água, onde ocorre um aumento da atividade da enzima através do mecanismo de ativação interfacial. Essas enzimas também catalisam reações de esterificação e transesterificação quando presentes em meio não aquoso (Saxena *et al.*, 2003, Pandey *et al.*, 1999, Jaeger e Reetz, 1998).

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, podendo ser produzidas por fermentação usando várias espécies de micro-organismos, tais com os fungos *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Geotrichum*, as leveduras *Tulopsis* e *Candida* e as bactérias *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Staphylococcus*. Do ponto de vista econômico e industrial, a produção de lipases microbianas é preferível frente às lipases de fontes animais e de plantas, devido ao alto custo do seu isolamento (Treichel *et al.*, 2010).

Na lipase, o sítio catalítico é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, que se repete em todas as estruturas e é frequentemente protegido na molécula por uma "tampa" hidrofóbica ou "lid", que ao interagir com a interface lipídio/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da "tampa" na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

De acordo com Soares *et al.* (1999) a presença da "tampa" não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, sendo que as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B, que apresentam a "tampa" em suas estruturas, não sofrem ativação interfacial. Por outro lado, as cutinases, enzimas consideradas lipases "verdadeiras", não apresentam a "tampa" e não precisam da interface para exercer a atividade hidrolítica.

As lipases microbianas constituem um grupo de importantes enzimas com aplicações biotecnológicas e na química orgânica (Treichel *et al.*, 2010) devido à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática, incluindo ampla especificidade pelo

substrato, região e enantió-seletividade na resolução de misturas racêmicas, além de facilidade de produção em grande quantidade (Hansan *et al.*, 2006; Dutra *et al.*, 2008; Rajendran e Thangavelu, 2009), estabilidade a altas temperaturas e ampla faixa de pH, o que tornam essas enzimas atraentes e versáteis (Freire e Castilho, 2000; Sharma *et al.*, 2001).

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e baixo custo; além disso, não requerem cofatores. Estes biocatalisadores possuem a habilidade de catalisar reações de esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade. O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional. As lipases têm sido extensivamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas, fisiológicas e possibilidade de aplicação industrial (Pandey *et al.*, 1999).

2.2 PRODUÇÃO DE LIPASES

As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (bactérias e fungos) e vegetal. A principal função biológica da lipase é catalisar a hidrólise de longas cadeias de triacilglicerídeos. Ao contrário de muitas outras enzimas, as lipases demonstram níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, o que facilita a catálise de muitas reações, tais como esterificação e transesterificação (Diaz *et al.*, 2006).

A produção de lipases pode ser influenciada por diferentes variáveis, como o micro-organismo produtor da enzima, as fontes de carbono e nitrogênio, a concentração de oxigênio dissolvido, a composição, temperatura e pH do meio, as condições de aeração e agitação e até mesmo a geometria do biorreator (Martins *et al.*, 2008).

As lipases são produzidas por um grande número de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras. Os fungos filamentosos são os preferidos como produtores industriais de lipases porque as enzimas produzidas por estes muitas vezes são extracelulares, o que facilita a extração do meio fermentado. Na produção de lipases a partir de bolores, os substratos lipídicos atuam como indutores em muitas espécies, nos quais as lipases são produzidas constitutivamente (Martins *et al.*, 2008; Treichel *et al.*, 2010).

As enzimas extracelulares podem ser produzidas em meio sólido ou líquido, que se diferenciam pela quantidade de água livre. A produção de lipase microbiana pode ser obtida no processo de Fermentação em Estado Sólido (FES) ou no processo de Substrato Líquido (FS). Em qualquer situação deve-se empregar meio de cultura que apresente baixo custo, contribuindo para a viabilização econômica do processo (Lin *et al.*, 2006).

Para que a produção de enzimas seja maximizada é de fundamental importância levar em consideração o meio fermentativo, este devendo proporcionar nutrientes necessários ao crescimento da cepa e produção de metabólitos, além de suprir a energia utilizada para biossíntese de manutenção da célula (Smits *et al.*, 1996). O meio deve ser composto por fonte de carbono, fonte de nitrogênio (seja ela orgânica ou inorgânica), sais orgânicos, vitaminas e indutores, quando necessários para a produção de lipase, visto que existem lipases induzíveis e constitutivas.

2.2.1 Micro-organismo

Os estudos sobre produção de lipases utilizando diversos micro-organismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Hasan *et al.*, 2006) iniciaram-se a partir de 1906, e hoje em dia se conhece um grande número de micro-organismos produtores de lipases, conforme demonstrado na Tabela 1. Entretanto, este número de micro-organismos conhecidos atinge apenas um percentual muito baixo da biodiversidade estimada dos micro-organismos que potencialmente podem ser produtores de enzimas em geral e que ainda não foram caracterizados: cerca de 0,2 a 0,6% para bactérias e de 5% para fungos filamentosos, bolores e leveduras (Fernandes *et al.*, 2007).

Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases obtidas de micro-organismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos) são as mais utilizadas, devido a sua relativa facilidade de produção e abundância de micro-organismos capazes de sintetizá-las.

Os bolores são valorizados porque as enzimas por eles produzidas de uma forma geral são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação e também porque a maioria destes não é nociva à saúde humana, sendo reconhecidos como GRAS (Generally Regarded As Safer) (Jaeger *et al.*, 1994). Entre os fungos, o gênero *Penicillium* se destaca por abranger muitos produtores: *P. expansum* (Stocklein *et al.*, 1993), *P. citrinum*

(Miranda *et al.*, 1999), *P. wortmanii* (Costa e Peralta, 1999), *P. chrysogenum* (Manuel *et al.*, 2000), *P. aurantiogriseum* (Lima *et al.*, 2004) e *P. expansum* (Dai *et al.*, 2005).

Tabela 2- Principais micro-organismos produtores de lipases em FS e FES

Fungos filamentosos	Referência
<i>Rhizopus</i> sp.	Martinez-Ruiz <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhizopus homothallicus</i>	Rodriguez <i>et al.</i> (2006)
<i>Aspergillus niger</i>	Dutra <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Martins <i>et al.</i> (2008)
<i>Phialemonium</i> sp.	Martins <i>et al.</i> (2008)
<i>Penicillium verrucosum</i>	Kempka <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus Níger</i>	Damaso (2008)
<i>Rhizopus chinensis</i>	Sun & Xu (2009)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Rajendran A.. <i>et al.</i> (2009)
<i>R. oryzae</i>	Kawakami. (2009)
<i>Mucor miehei</i>	Shamel <i>et al.</i> (2007)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Dizgea <i>et al.</i> (2009)
<i>Rhizopus chinensis</i>	Teng.; Xu.; Wang (2009)
<i>Penicillium</i> sp.	Rigo <i>et al.</i> (2010)
<i>Penicillium crustosum</i>	Ferraz <i>et al.</i> (2010)
Bactéria	Referência
<i>Pseudomonas</i> sp.	Cheirsilp <i>et al.</i> (2009)
<i>Bacillus subtilis</i>	Takaç (2008)
<i>Bacillus</i> sp.	Ertugual (2007)
<i>Bacillus coagulans</i>	Alkan <i>et al.</i> (2006)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gupta <i>et al.</i> (2008)
Levedura	Referência
<i>Candida cylindracea</i>	D'Annibale <i>et al.</i> (2006)
<i>Yarrowia lipolytica</i> (cepa mutante)	Fickers (2009)
<i>Candida antartica</i>	Rodrigues <i>et al.</i> (2008)
<i>Candida cylindracea</i>	Brozzoli <i>et al.</i> (2009)
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Ferraz <i>et al.</i> (2011)

Fonte: o autor (2011)

Fungos filamentosos de diversos gêneros demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial.

Dentre as bactérias produtoras de lipases comercialmente estão disponíveis as enzimas de *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens*, *Burkholderia* (*P.*) *cepacia* para a aplicação em síntese quiral e as lipases de *Burkholderia* sp e *Arthrobacter* sp., utilizadas na determinação diagnóstica de triacilgliceróis. O rápido crescimento celular em relação aos fungos filamentosos é uma das vantagens citadas das fontes bacterianas como produtoras destas enzimas (Jaeger *et al.*, 1998).

As espécies de leveduras encontradas para a produção de lipases são: *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Candida antarctica*, *Candida cylindracea*, *Candida parapsilopsis*, *Candida deformante*, *Candida curvata*, *Candida valida*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula pilimornae*, *Pichia bispora*, *Pichia mexicana*, *Pichia sivecicola*, *Pichia xylosa*, *Pichia burtonii*, *Saccharomycopsis crataegenesis*, *Torulaspora globosa* e *Trichosporon asteroides* (Treichel *et al.*, 2010).

2.2.2 Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação envolvendo sólidos em ausência ou quase ausência de água livre é denominada de FES, sendo que o substrato deve possuir umidade suficiente para proporcionar o desenvolvimento do metabolismo dos micro-organismos (Singhania *et al.*, 2009). O desenvolvimento deste sistema envolve aspectos de Engenharia Bioquímica, incluindo a cinética, modelagem matemática, *design* de biorreatores e sistemas de controle avançado (Couto e Sanromán, 2005; Holker e Lenz, 2005; Pandey, 2003). A baixa umidade encontrada neste processo significa que a fermentação só pode ser efetuada por um número limitado de micro-organismos como leveduras e fungos filamentosos, embora algumas bactérias também tenham sido estudadas com sucesso neste sistema (Pandey *et al.*, 2000).

No Brasil, desde 1986 uma série de projetos de pesquisa envolvendo produtos agrícolas tropicais e subprodutos utilizados como substratos para FES foram desenvolvidos, principalmente devido à grande quantidade de resíduos agrícolas gerados por este país (Soccol e Vandenberghe, 2003).

Portanto, a FES é uma excelente forma de utilização dos resíduos sólidos como substrato. Os alimentos e resíduos agrícolas são produzidos em grandes quantidades e, uma

vez que são ricos em carboidratos e outros nutrientes, podem servir como um substrato para a produção de compostos químicos a granel e enzimas utilizando FES (Pandey *et al.*, 1999). Esse processo é conhecido desde os tempos antigos e vários tipos de bolores foram cultivados em FES para a produção de alimentos. Exemplos típicos consistem na fermentação do arroz por *Aspergillus oryzae* para iniciar o processo “koji” e *Penicillium roquefortii* para produção de queijo.

A FES apresenta várias vantagens biotecnológicas, tais como aumento da produtividade de fermentação, aumento na concentração de produtos, alta estabilidade do produto, menor repressão catabólica, cultivo de micro-organismos especializados para substratos insolúveis em água ou cultura mista de vários fungos, e por último, mas não menos importante, a redução da demanda sobre a esterilidade devido à baixa atividade de água utilizada em FES (Hölker *et al.*, 2004; Singhania *et al.*, 2009). Ainda dentre as vantagens apresentadas por esta técnica pode-se citar a simplicidade dos meios de fermentação e dos equipamentos utilizados, podendo, além disso, promover altos rendimentos de produção, menor demanda de energia, entre outras (Mahadik *et al.*, 2002).

As condições de crescimento da FES aproximam-se do *habitat* natural de fungos filamentosos, o que facilita o crescimento deste no substrato sólido e a produção de grandes quantidades de enzimas. Os resíduos gerados nos processos agroindustriais podem ser usados como substrato para o crescimento celular. A matéria orgânica presente neste material é usada como fonte de energia para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (Silva *et al.*, 2005).

No entanto, a FES geralmente é lenta, em função da barreira à transferência de massa gerada durante a fermentação. Entretanto, os processos metabólicos dos micro-organismos são influenciados pela mudança de temperatura, de pH, de substrato, do índice de umidade, do fornecimento de ar, da concentração de inóculo, etc., sendo que estas circunstâncias variam extensamente de espécie para espécie. Assim, torna-se muito importante saber as condições ambientais dos micro-organismos para a máxima produção da enzima de interesse (Ellaiah *et al.*, 2004).

Portanto, a FES é uma ferramenta promissora para a produção de metabólitos microbianos, por fazer uso de um meio barato, já que pode utilizar resíduos agroindustriais como substrato.

2.2.3 Substratos utilizados na fermentação em estado sólido

O setor agroindustrial e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos como sólidos. Esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e possuem características de poluente, além de representarem, muitas vezes, perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor. Ao contrário do que acontecia no passado, quando resíduos eram dispostos em aterros sanitários ou empregados sem tratamento para ração animal ou adubo, atualmente, conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais.

A bioconversão, em particular, dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos está recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis. Nesse contexto, a FES desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industrial, além de elevado valor agregado (Pinto *et al.*, 2005).

Existem vários exemplos na literatura relacionando o uso de substratos naturais e suportes inertes na produção de enzimas e outros compostos de alto valor comercial por FES. Os principais resíduos que podem ser utilizados são as tortas derivadas dos processos de extração do óleo de milho (torta de milho), óleo de girassol (torta de girassol) e soja (torta de soja), materiais abundantes no Brasil, e que normalmente oferecem um potencial poluente muito elevado.

Outros substratos que podem ser utilizados em FES são a torta de babaçu; farelo de trigo; o bagaço de mandioca, gerado pela indústria de processamento de amido, que possui entre 40 a 60 % de amido residual; o bagaço de cana; e o pó de serra, gerado pela indústria madeireira. Estes representam somente uma pequena proporção dos substratos que podem ser utilizados na produção de metabólitos com aplicação industrial (Mahadik *et al.*, 2002; Ul-Haq *et al.*, 2002; Castilho *et al.*, 2000; Gombert *et al.*, 1999).

A natureza do substrato sólido empregado é o fator mais importante que afeta os processos de FES e sua seleção depende de vários fatores, principalmente relacionados com custo e disponibilidade e, portanto, pode envolver a triagem de vários resíduos agroindustriais (Shingania *et al.*, 2009). No processo de FES o substrato sólido, não só fornece os nutrientes

para a cultura, mas também serve como um ponto de ancoragem para as células microbianas. Vários autores relatam que os fatores mais importantes para o crescimento e atividade microbiana em um determinado substrato são o tamanho de partícula e o nível de atividade de umidade/água. Geralmente, as partículas menores do substrato proporcionam uma maior área de superfície para o ataque microbiano, mas se forem demasiado pequenas podem resultar em aglomeração do substrato, bem como crescimento deficiente. Em contraste, as partículas maiores proporcionam uma melhor aeração, mas uma superfície limitada para o ataque microbiano. Portanto, um tamanho de partícula ideal deve ser selecionado para cada processo em particular (Pandey *et al.*, 1999).

A investigação sobre a seleção de substratos apropriados para FES tem sido essencialmente centrada em torno de resíduos agroindustriais devido às suas vantagens para os fungos filamentosos, que são capazes de penetrar nos substratos sólidos, auxiliados pela presença de pressão na ponta do micélio (Ramachandran *et al.*, 2004). Cordova *et al.* (1998) investigaram o uso de bagaço de cana de açúcar e torta de oliva (resíduo da indústria de óleo de oliva) para a produção de lipases por *Rhizopus rhizopodiformis* e *Rhizomucor pusillus*. As maiores atividades enzimáticas obtidas foram de 79,6U/g com *R. rhizopodiformis* e 20,2U/g com *R. Pusillus*, respectivamente quando se utilizou uma mistura de 50:50 dos substratos estudados.

Na formulação do meio de fermentação várias fontes de carbono (substrato principal) são utilizadas, entre elas cita-se farelo de trigo (Ellaiah *et al.*, 2004), farelo de arroz (Ellaiah *et al.*, 2004; Ferraz *et al.*, 2010a), farelo de cevada (Dominguez *et al.*, 2003), bagaço de cana-de-açúcar (Cordova *et al.*, 1998; Ellaiah *et al.*, 2004), torta de côco (Benjamin e Pandey, 2000), torta de soja (Vargas *et al.*, 2008), torta de babaçu (Palma *et al.*, 2000; Gombert *et al.*, 1999; Castilho *et al.*, 2000), entre outros, além da incorporação opcional de alguma fonte de carbono indutora para a produção de lipases (óleos, ácidos graxos, detergentes). Em alguns casos, fontes de nitrogênio complementares são utilizadas: água de maceração de milho, extrato de levedura, uréia, sais de amônio e outros. Sais metálicos e micro-elementos podem ser suplementados para suprir as necessidades do micro-organismo.

As tortas residuais de processos de extração de óleos são bastante usadas na indústria de alimentos para animais, por possuírem boas quantidades de proteína. Muitos estudos têm avaliado o uso das tortas oleaginosas em bioprocessos. Aplicação biotecnológica de torta de girassol, soja, côco, mostarda, palma, algodão, canola, oliva entre outras, podem ser utilizadas para obtenção de enzimas, antibióticos, biopesticidas, vitaminas, etc. Na produção

de enzimas, as tortas são usadas como substratos para FES ou como suplemento do meio de produção, em termos de fonte carbono e nitrogênio (Ramachandran *et al.*, 2007). A Tabela 2 demonstra alguns resíduos e micro-organismos envolvidos no processo de FES.

Tabela 3-Substratos e micro-organismos utilizados em processo de fermentação em estado sólido

Micro-organismo	Substratos	Referência
<i>Bacillus coagulans</i>	Farelo de trigo, resíduos (banana, melão, melancia, lentilha e arroz)	Alkan <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhizopus homothallicus</i>	Bagaço de cana	Rodriguez <i>et al.</i> (2006)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	Dutra <i>et al.</i> (2008)
<i>Penicillium verrucosum</i>	Óleo de babaçu	Kempka <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo e sabugo de milho	Damaso (2008)
<i>Phialemonium</i> sp.	Farelo desengordurado e casca de arroz	Martins <i>et al.</i> (2008)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sementes de <i>Jatropha curcasa</i>	Gupta <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhizopus chinensis</i>	Farelo de trigo e farinha de trigo	Sun e Xu (2008)
<i>Penicillium crustosum</i>	Farelo de soja e farelo arroz	Ferraz <i>et al.</i> (2010)

Fonte: o autor (2011)

2.2.4 Suplementação do meio fermentativo

A escolha do suplemento de um meio fermentativo deve levar em conta a relação de carbono/nitrogênio, quantidade de água e concentração de minerais (Rigo *et al.*, 2009).

Quando o óleo de oliva é a única fonte de carbono, o micro-organismo utiliza-o de forma sequencial. Inicialmente o óleo de oliva é hidrolisado por uma pequena quantidade de lipase proveniente do próprio inóculo em glicerol e ácidos graxos. Em seguida o micro-organismo consome o glicerol liberado, ainda sem a produção de lipase. Finalmente, os

ácidos graxos são consumidos com a indução da produção de uma quantidade significativa de lipases (Montesino *et al.*, 1996).

Estudando a produção de lipases por fermentação em estado sólido, Palma *et al.* (2000) utilizaram o fungo *Penicillium restrictum* e torta de babaçu como meio basal. O meio foi enriquecido com peptona, Tween 80 e óleo de oliva verificando-se que a maior atividade lipásica (27,8 U/g em 25 horas de fermentação) foi obtida quando se utilizou a peptona como suplemento.

A produção de lipases por *Penicillium simplicissimum* em meio sólido usando torta de soja como substrato foi estudado por Vargas (2008). Foi constatado que a maior produção da enzima (30 U/g em 80 horas de fermentação) ocorreu sob as condições de 27,5 °C e 55 % de umidade do meio levando em consideração que a torta de soja é rica em nutrientes e não necessita de adição de fontes suplementares de carbono e nitrogênio para aumentar a produção de lipases.

Domínguez *et al.* (2003) investigaram a produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* por fermentação em estado sólido. Observou-se que o uso de materiais orgânicos como suporte para a produção de lipases, além de diminuir os custos de produção da enzima, proporciona maiores atividades lipásicas quando comparado ao uso de suportes sintéticos. Concluiu-se que a utilização de nozes trituradas como substrato gerou cerca de 69 U/g de atividade enzimática em 10 dias de fermentação, superando os resultados obtidos com farelo de cevada suplementado com óleo de girassol, milho e oliva.

Um meio balanceado pode conter dez vezes mais carbono do que nitrogênio. Essa relação (10:1) garante um alto conteúdo protéico, enquanto uma relação maior, como (50:1), favorece o acúmulo de álcool, metabólitos secundários derivados do acetato, lipídios ou polissacarídeos extracelulares. Dessa maneira, deve-se tomar o devido cuidado e atenção com a relação C/N durante o processo fermentativo (Carlile e Watkinson, 1997 *apud* Gonçalves, 2007).

Rigo *et al.* (2010), pesquisando a produção de lipases com diferentes características alcalinas e ácidas, encontraram no farelo de soja suplementado com óleo de soja e uréia as atividades lipásicas de 139,2 e 140,7 U/g de substrato seco em 48 horas de fermentação para os micro-organismos isolados codificados como P58 e P74, respectivamente.

2.2.5 Fatores que afetam a produção de lipase

Várias condições têm sido descritas na literatura como estimulantes ou repressoras da produção de lipases por micro-organismos. As etapas mais importantes de um processo biológico são modelagem e otimização do sistema que servem para aumentar a eficiência do processo sem alto custo (Hasan *et al.*, 2009). Há certos fatores ambientais que desempenham papel importante durante a produção da enzima e atividades metabólicas, entre eles estão fatores físicos (pH da cultura, memória do pH; estabilidade da enzima frente ao substrato; temperatura da reação, tamanho do inóculo; agitação e tempo de incubação) e fatores bioquímicos (tipo de substrato; especificidade ao substrato; regio-especificidade; suplementação do meio; íons inorgânicos; fontes de carbono e nitrogênio; aditivos).

O trabalho realizado por Vardanega *et al.* (2010) mostra algumas variáveis que afetam a extração de lipase obtida por FES de farelo de soja utilizando o fungo filamentoso *Penicillium* sp. Os autores avaliaram as variáveis: pH (5,5-8,5), taxa de agitação (50-150 rpm), temperatura (25-49 °C) e relação sólido/líquido (1:20-5:20). O efeito do tempo de contato foi avaliada em um estudo cinético. Atividades superiores de lipase no estudo de extração foram obtidas utilizando tampão fosfato 100 mM, pH 8,5, a 25 °C, 150 rpm, e relação sólido/líquido de 1:20. Os estudos mostraram que a atividade máxima (186 U/g) foi obtida após 15 min de extração.

Quando uma nova cepa de *Penicillium* sp. foi isolada e testada para produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) por Wolski *et al.* (2009), a caracterização parcial do extrato bruto enzimático obtido demonstrou atividade ótima em pH 5,5 e 47 °C (15,17 U/mL). O extrato bruto enzimático obtido pela FES apresentou melhor estabilidade em pH 7,0 e 25 °C.

O estabelecimento das relações entre a fisiologia dos micro-organismos e os fatores físico-químicos é o objetivo para o desenvolvimento de modelos adequados. Entre vários fatores, pode-se citar umidade e a natureza do substrato sólido empregados são os mais importantes fatores que influenciam os processos de FES. A definição da umidade depende do micro-organismo utilizado, e também da natureza do substrato. Fungos necessitam menor umidade, 40-60% de umidade pode ser suficiente, mas a seleção do substrato depende de vários fatores principalmente relacionados com o custo e disponibilidade e, portanto, pode envolver a triagem de resíduos agroindustriais diversos (Singhania *et al.*, 2009).

Uma revisão apresentada por Hansan *et al.* (2009) descreve alguns fatores físicos e físico-químicos/bioquímicos que afetam a atividade enzimática, conforme dados apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 4- Fatores físicos que podem afetar o processo de fermentação em estado sólido

Fatores físicos	Condição	Referência
pH e Temperatura		
<i>Bacillus</i> sp. FH5	pH 8; 37 °C	Hasan <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus thermoleovorans</i> IHI-91	pH 6,0; 65 °C	Markossian <i>et al.</i> (2000)
<i>Bacillus coagulans</i> BTS-3 <i>thermophilic</i>	pH 8,5; 55 °C	Kumar <i>et al.</i> (2005)
<i>Bacillus cereus</i>	pH 8,0 por 24 h; 30-33 °C	Dutta e Ray (2009)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	pH 7,0; 30 °C	Chen <i>et al.</i> (1998)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	pH 7,0; 30 °C por 48 h	Zhen-Qian e Chun-Yun (2009)
<i>Penicillium candidum</i>	pH 9; 35 °C	Ruiz <i>et al.</i> (2001)
<i>Cryptococcus</i> sp. S2	pH 5,6; 25 °C	Kamini <i>et al.</i> (2000)
Efeito do tempo de incubação		
<i>Bacillus</i> sp. (termofílico)	36 h	Handelsman e Shoham (1994)
<i>Bacillus</i> sp. FH5	24 h	Ebrahimpour <i>et al.</i> (2008)
<i>Penicillium wortmanii</i>	7 dias	Costa e Peralta (1999)
<i>Rhizopus oryzae</i>	4 dias	Hiol <i>et al.</i> (2000)
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	120 h	Kamini <i>et al.</i> (2000)
Efeito da idade do inóculo		
<i>Bacillus</i> sp.	6 h	Sidhu <i>et al.</i> (1998)
<i>Bacillus</i> sp. FH5	24 h	Hasan <i>et al.</i> (2006)
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	18 h	Elwan <i>et al.</i> (1978)
Efeito do tamanho do inóculo		
<i>Bacillus thermoleovorans</i> ID-1,	1 %	Lee <i>et al.</i> (1999)
<i>Bacillus</i> sp. FH5	5 %	Hasan <i>et al.</i> (2006)
<i>Geobacillus</i> sp. ARM	1 %	Ebrahimpour <i>et al.</i> (2008)
Efeito da agitação		
<i>Candida rugosa</i>	180 rpm	Song <i>et al.</i> (2001)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> LP009	200 rpm	Pratuangdejkul e Dharmsthiti (2000)
<i>Salinivibrio</i> sp. SA-2	150 rpm	Amoozegar <i>et al.</i> (2008)

Fonte: Hasan *et al.* (2009).

Tabela 5-Fatores físico-químicos e bioquímicos que podem afetar o processo de fermentação em estado sólido

Parâmetros físico-químicos	Condições	Referência
Meio de crescimento		
<i>Candida rugosa</i>	0,1 % glicose, 4,0 % azeite oliva, 0,3 % NH_4NO_3 , 1,2% K_2HPO_4 e 0,4% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Song <i>et al.</i> (2001)
<i>Bacillus circulans</i>	meio líquido suplementado com 2 e/ou 30 % sacarose	Elwan <i>et al.</i> (1983)
<i>Bacillus</i> sp.	0,5 % farelo de soja e 0,1 % ésteres de glicerol ou gordura natural	Kambourova <i>et al.</i> (1996)
<i>Bacillus</i> THL027	2 % (v/v) solução tampão(7,3 % (w/v) Na_2HPO_4 , 3,2 % (w/v) KH_2PO_4 , pH7,2, 40 $\mu\text{g/mL}$ FeSO_4 e 40 $\mu\text{g/mL}$, MgSO_4 , 0.1% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ suplementado com 3 % NaCl , 0,1% glicose, 1,0 % óleo farelo arroz 0,5% (w,v) farelo arroz	Dharmsthiti e Luchai (1999)
<i>Bacillus</i> sp. FH5	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7 %, K_2HPO_4 3 %, NH_4Cl 1 %, NaCl 0,5%, glicose 4%, MgSO_4 0,25%, CaCl_2 0,02% ácido casamino 2,5, 10% azeite oliva	Hansan <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus</i> sp.	10 g/L extrato levedura, 15 g/L NH_4Cl , 3g/L K_2HPO_4 , 1 g/L KH_2PO_4 , 0,1 g/L MgSO_4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L glicose, 0,6 mM MgCl_2 e 15 mL/L azeite oliva	Heravi <i>et al.</i> (2008)
Efeito do substrato		
<i>Bacillus thermoleovorans</i>	azeite oliva (1,5 %, w/v)	Lee <i>et al.</i> (1999)
<i>Bacillus</i> sp. LBN4	azeite oliva e extrato levedura	Bora e Kalita (2007)
<i>Acinetobacter baumannii</i> BD5	p-NP caprato (C10)	Park <i>et al.</i> (2009)
Efeito NaCl e sais biliares		
<i>Candida rugosa</i>	NH_4NO_3	Song <i>et al.</i> (2001)
<i>Penicillium roqueforti</i>	estimulado com NaCl	Larsen Jensen (1999)
Efeito da fonte de C/N		
<i>Bacillus</i> sp. FH5	extrato levedura, Salicin	Hasan <i>et al.</i> (2006)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	lactose, extrato de carne e extrato de levedura	Zhen-qian e Chun-yun (2009)
<i>Serratia marcescens</i> SM-6	glicogênio e pectina B	Winkler <i>et al.</i> (1978)
<i>Serratia marcescens</i>	polissacarídeos; glicogênio, hialuronato, pectina B e goma arábica	Winkler <i>et al.</i> (1979)
Efeito da Conc. substrato		
<i>Bacillus licheniformis</i> B-42	1,5 g/L	Bayoumi <i>et al.</i> (2007)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	2,5 g/L	Bayoumi <i>et al.</i> (2007)

Fonte: Hasan *et al.* (2009).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES

Diversos pesquisadores têm estudado o efeito de vários fatores na atividade e estabilidade de lipases brutas e purificadas. Fatores como pH, temperatura, efeito de íons metálicos, solventes orgânicos, detergentes/surfactantes e outros inibidores podem aumentar ou suprimir a atividade das lipases. Além disso, por ser uma enzima versátil, a lipase apresenta variadas especificidades aos substratos reacionais. A caracterização bioquímica das lipases determina a adequação da enzima para a aplicação em diferentes processos industriais (Hasan *et al.*, 2006).

2.3.1 Especificidade pelo substrato

A especificidade ao substrato vem sendo intensamente investigada em sistemas reacionais bifásicos e meios reacionais orgânicos. Modelos cinéticos usualmente baseados na aplicação das suposições de Michaelis-Menten foram propostos, como aqueles que empregam um fator de competição para expressar a especificidade ao substrato (Peter e Preda, 2002).

A especificidade ao substrato de lipases em reações de esterificação é importante para obter um melhor entendimento da relação estrutura-função e melhorar os parâmetros reacionais, proporcionando maiores conversões e aplicabilidade (Peter e Preda, 2002). Dependendo das características de especificidade da lipase, esta pode se tornar atraente para diferentes aplicações em áreas industriais potenciais (Sun e Xu, 2009).

As lipases são capazes de catalisar reações com uma ampla faixa de substratos, mas as taxas de reação variam amplamente com a estrutura das moléculas do substrato. As diferentes afinidades de uma molécula de lipase por diferentes álcoois e ácidos graxos pode ser entendida em termos da energia de ligação que é liberada quando um substrato se liga ao sítio ativo das lipases. Poucos dos muitos substratos que se ligam ao sítio ativo podem liberar uma quantidade suficiente de energia de ligação para ocasionar uma mudança na conformação da lipase para uma forma mais eficiente cataliticamente (Abbas e Comeau, 2003). A especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura

do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (hidratação estérica e interações hidrofóbicas) (Rigo, 2009).

2.3.2 Estabilidade térmica

A termoestabilidade de um biocatalisador permite uma maior temperatura operacional, o que é claramente vantajoso devido à maior reatividade (maiores taxas reacionais, menores restrições difusionais), maior estabilidade, maior rendimento de processo (solubilidade dos substratos e produtos aumentada e deslocamento favorável do equilíbrio em reações endotérmicas) e risco reduzido de contaminação microbiológica (Hasan *et al.*, 2006). De acordo com o texto, a estabilidade térmica é uma característica desejável para as lipases (Sharma *et al.*, 2001).

Enzimas termoestáveis podem ser obtidas de organismos mesofílicos e termofílicos; até psicrófilos podem produzir algumas enzimas termoestáveis. Enzimas termoestáveis obtidas a partir de fontes microbianas são altamente vantajosas para aplicações biotecnológicas, já que podem ser produzidas com baixos custos e exibem alta estabilidade. Nos últimos anos, há uma grande demanda por enzimas termoestáveis na área industrial (Hasan *et al.*, 2006).

A estabilidade térmica de uma lipase está obviamente relacionada com a sua estrutura (Sharma *et al.*, 2001). Em baixos teores de água, como é o caso das enzimas liofilizadas, as moléculas de enzima apresentam certa rigidez conformacional, que é responsável por algumas consequências interessantes observadas em solventes orgânicos anidros. Uma dessas causas é a maior estabilidade quando submetida a temperaturas elevadas, já que a conformação rígida é mais estável que a flexível (observada na forma totalmente hidratada da enzima). Além da rigidez, outra razão para o aumento da estabilidade é que vários processos covalentes envolvidos na inativação irreversível de proteínas como a desaminação, hidrólise peptídica e decomposição da cistina requerem água. Esses processos irreversíveis são também extremamente lentos em baixos teores de água (Gupta, 1992).

Outra propriedade importante a ser avaliada é a estabilidade ao longo do período de armazenamento em baixas temperaturas (Menoncin *et al.*, 2009). O estudo da estabilidade da enzima em baixas temperaturas indica a melhor temperatura de estocagem da enzima para aumentar a sua vida de prateleira.

2.3.3 Efeitos de temperatura e memória de pH

A rigidez conformacional das moléculas de enzima contidas nos extratos enzimáticos liofilizados pode ser causada pela memória de pH. Quando a enzima é ‘transferida’ da água para solventes orgânicos, a ‘conformação’ desta no meio aquoso é mantida. Dessa forma, a conformação da enzima em diferentes valores de pH no meio aquoso é mantida após a liofilização (Gupta, 1992).

A atividade enzimática em solventes orgânicos depende do pH da solução aquosa antes da liofilização, porque a memória de pH é atribuída a uma fixação das ionizações dos grupos protéicos catalíticos após a secagem da preparação biocatalítica (Sun e Xu, 2009).

Muitos resultados são apresentados na literatura em relação às faixas de atuação de lipases em função do pH e da temperatura. Contudo, a comparação destes resultados torna-se difícil, já que o comportamento da enzima pode variar de acordo com os métodos fermentativos, meios e micro-organismos empregados, bem como diferentes sistemas e grau de purificação (Rigo *et al.*, 2010). O comportamento da enzima normalmente é avaliado em valores de pH em torno da neutralidade, mas também em valores fortemente ácidos (pH 2,0) a fortemente alcalinos (pH 12,0); e temperaturas em torno da média (30-40 °C), mas variando entre 20 e 100 °C.

Poucas referências existem atualmente na literatura em relação à avaliação do comportamento de lipases com atividade de síntese de éster frente a diferentes temperaturas e memórias de pH. Dentre as referências utilizadas na discussão desse trabalho, podem-se citar os trabalhos desenvolvidos por Sun e Xu (2009) e Smaniotto (2010).

2.4 PRÉ-PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Diversas técnicas têm sido empregadas para a purificação de lipases, a precipitação de proteínas muitas vezes é usada como primeiro passo de purificação e neste caso o sulfato de amônio é o agente de precipitação mais utilizado (Gupta e Ray, 2004).

De acordo com Martins *et al.* (2008), a técnica de precipitação das proteínas com sais, aplicada como pré-tratamento do meio contendo a enzima de interesse, facilita os processos subsequentes devido à ausência de possíveis interferentes. Esta metodologia consiste em uma

das técnicas de concentração de proteínas, para separação das mesmas dos outros compostos do meio. A concentração pela adição de sais, como sulfato de amônio, baseia-se no aumento da força iônica, de tal forma que as moléculas protéicas se agregam e precipitam. O sal é adicionado ao sobrenadante até uma porcentagem de saturação em que a enzima de interesse é precipitada e separada por centrifugação. A composição do extrato, sua concentração e temperatura podem influenciar a precipitação, no caso das enzimas a temperatura deve ser mantida baixa (4 °C). A adição do sal deve ser lenta e sob agitação para favorecer a homogeneidade. Após a centrifugação, o precipitado deve ser redissolvido em tampão adequado, utilizando-se um volume de aproximadamente duas vezes o volume de precipitado (Borzani *et al.*, 2001).

A avaliação do uso de diferentes concentrações de sulfato de amônio para precipitação da lipase produzida através do sistema de FES com *Penicillium verrucosum* foi estudada através planejamento experimental, abrangendo a faixa de 32 a 88 % de saturação. A concentração de 60% de saturação foi apresentada como a que resultou no maior de atividade específica (0,91 U/mg) após 5 horas de precipitação a temperatura ambiente (25 °C). Deve-se ressaltar que, neste caso, o processo de diálise não apresentou efeito no aumento da atividade da proteína em relação à precipitada (Menoncin *et al.*, 2009).

Redução da atividade enzimática, alterações de temperatura e pH ótimo de atuação e de estabilidade são algumas das características que podem ser afetadas com o processo de purificação, apesar da importância do estudo da purificação da enzima é preciso considerar que por mais adequado que seja o processo escolhido, este sempre vai causar alterações na enzima (Maldonado, 2006).

2.5 APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE LIPASES

A aplicação de biocatalisadores na indústria é objeto de muitas investigações, devido à alta atividade catalítica em comparação com os catalisadores convencionais, e ao fato de atuarem com alta eficiência em condições reacionais amenas.

As lipases são utilizadas em diversos campos de aplicação, devido às suas características biocatalíticas. A Tabela 5 sintetiza as principais aplicações das lipases em diferentes segmentos (Martins *et al.*, 2008; Hasan *et al.*, 2006; Jaeger e Eggert, 2002; Villeneuve *et al.*, 2000), considerando as reações de hidrólise e a esterificação.

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas e aprimoradas para a obtenção de maiores rendimentos de produção, além de enzimas mais robustas e altamente específicas para cada tipo de aplicação, ampliando as possibilidades de aplicações industriais destes biocatalisadores (Soccol e Vandenberghe, 2003).

Tabela 6- Principais aplicações de lipases em diferentes segmentos

Indústria	Aplicações	Produtos
Hidrólise		
Alimentos	Hidrólise da gordura do leite	Desenvolvimento de “flavour” em produtos lácteos
Química	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, mono diglicerídeos; Biossurfactantes Redução de sólidos
	Biorremediação	
	Tratamento efluente gorduroso	
Química (detergentes)	Análise de ácidos graxos de TGC	Detergentes (roupas e superfícies)
	Remoção de manchas de gorduras	
Médica	Análise de triglicerídeos do sangue	Kits de diagnóstico
Farmacêutica, agroquímica	Hidrólise estereo-específica	Resolução misturas racêmicas
Esterificação		
Química (química fina)	Síntese de ésteres	Compostos quirais intermediários terapêutico; Ésteres e emulsificantes; “Flavour”, Fragrância para cosméticos
Alimentos, Química, Farmacêutica	Transesterificação (óleos naturais)	Óleos e gorduras: análogos de manteiga de cacau, Biodiesel
Têxtil	Síntese de poliésteres	Poliésteres biodegradáveis, aromáticos,
Alimentos	Síntese de ésteres	Aromas para alimentos e bebidas

Fonte: Rigo, 2009

As características bioquímicas das lipases produzidas, como temperatura de atuação e as faixas de pH, as estabilidades quando submetidas à altas temperaturas ou armazenadas em baixas temperaturas ou temperatura ambiente e a especificidade aos substratos reacionais são de extrema importância para determinar suas possíveis aplicações. Com base nestes aspectos e também na lacuna encontrada na literatura em relação à produção e caracterização de lipases produzidas por micro-organismos isolados e pré-selecionados, o presente trabalho tem

como objetivo geral investigar a produção e caracterização parcial das lipases obtidas por fermentação em estado sólido do fungo filamentoso *Penicillium crustosum* e da levedura *Sporobolomyces ruberrimus* utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substratos, visando posterior aplicação do extrato enzimático obtido como catalisador em reações de interesse industrial.

O aspecto conjunto de produção de enzimas por FES com aproveitamento de resíduos e a geração de produtos de alto valor agregado, vislumbrando sua aplicação industrial, justificam plenamente este trabalho, considerando o aumento dos volumes de resíduos agroindustriais gerados nas indústrias, associado à crescente preocupação com os impactos ambientais destes e uma legislação ambiental cada vez mais rígida.

2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão da literatura apresentada permitiu concluir que as lipases de origem microbiana apresentam um grande potencial de aplicações biotecnológicas. Até a presente data as lipases de levedura de *Candida rugosa* e *Candida antarctica* são as principais fontes de muitas lipases disponíveis comercialmente e têm sido amplamente utilizadas em diferentes áreas. Ao mesmo tempo, a demanda contínua por enzimas altamente ativas com propriedades apropriadas encoraja a pesquisa por novas fontes de enzimas. Sendo assim, é de grande importância a realização de estudos sobre condições apropriadas de produção de lipases a partir de micro-organismos isolados e pré-selecionados, incluindo o estudo da sua produção em meios de baixo custo, como os resíduos agroindustriais. Portanto, o estudo para a máxima produção de lipases microbianas a partir de novas cepas microbianas e com a utilização de resíduos agroindustriais é de grande valia.

CAPÍTULO 3

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais, procedimentos experimentais e a metodologia analítica utilizados para o desenvolvimento do estudo relacionado à produção e caracterização de lipases extracelulares em termos de atividade de esterificação obtidas por fermentação em estado sólido (FES) em farelo de soja, de arroz, de algodão e bagaço de cana com o fungo filamentoso *Penicillium crustosum* e a avaliação dos substratos e otimização da produção em termos de atividade de esterificação para a levedura *Sporobolomyces ruberrimus*.

3.1 MATERIAL

Os principais reagentes utilizados no decorrer deste trabalho foram:

- Acetona (Quimex);
- Ácido bórico (Nuclear);
- Ácido sulfúrico concentrado (Quimex);
- Água de maceração de milho;
- Azeite de oliva (Carbonelli);
- Bagaço de cana (destilaria local);
- Biftalato de potássio (Nuclear);
- Butan-1-nol seco (máx. 0,005% H₂O) (Merck);
- Carço de algodão (Bahia).
- Etanol 95% (Quimex);
- Farelo de arroz (Polisul, Santa Vitória do Palmar, RS);
- Farelo de soja (Olfar, Erechim, RS);
- Fenolftaleína (Nuclear);

- Fosfato de sódio (Vetec);
- Hidróxido de sódio (Nuclear);
- Hidróxido de sódio (Nuclear);
- Meio PDA (Batata, Dextrose, Agar) (Acumedia);
- Melaço de cana de açúcar;
- Metanol seco (máx. 0,005% H₂O) (Merck);
- Propan-1-ol (Vetec);
- Óleo de arroz (Carreteiro);
- Óleo de soja (Soya);
- Pastilha catalisadora (sulfato de potássio e selênio) (Velp Científica);
- Sulfato de Amônia (Vetec);
- Uréia (Synth).

3.2 EQUIPAMENTOS

Os principais equipamentos utilizados no decorrer deste trabalho foram:

- Agitador orbital (Marconi MA-410);
- Agitador magnético (Fisatom);
- Balança analítica (Bel Engineering);
- Câmara de fluxo laminar (Pachane);
- Dessecador com sílica (Vidralabor, Thermex);
- Destilador Kjeldahl (Marconi, modelo MA036);
- Extrator de Soxhlet (Marconi, modelo MA491);
- Espectrofotômetro (Agilent Technologies 8453);
- Estufa com circulação de ar (Fanem, modelo 320SE);
- Freezer -80°C (Hitachi);
- Germinadora para incubação (Tecnal TE-401);
- Liofilizador (Edwards Modulyo);
- Micro-ondas Philco (modelo PMW 110);
- Medidor de pH digital (Gehaka, modelo PG2000);
- Titulador automático (Mettler Toledo DL 50 Graphix).

3.3 MÉTODOS

A seguir serão apresentadas as metodologias experimentais empregadas para obtenção de lipases extracelulares com atividade de esterificação, através de fermentação em estado sólido (FES) investigando diferentes resíduos agroindustriais como substratos e os micro-organismos *P. crustosum* (fungo filamentoso) e *S. ruberrimus* (levedura).

As etapas realizadas encontram-se descritas abaixo:

a) Caracterização dos substratos e dos suplementos utilizados no processo de fermentação para os dois micro-organismos;

- Umidade
- Cinzas
- Lipídios
- Nitrogênio
- Proteínas
- Minerais
- pH.

b) Avaliação da cinética da produção de lipase e atividade de esterificação através do fungo *Penicillium crustosum*;

- Avaliação do efeito da umidade e temperatura na produção da lipase.
- Avaliação do efeito dos suplementos nos farelos de soja e de arroz para obtenção da máxima atividade de esterificação.

c) Avaliação da cinética da produção de lipase e atividade de esterificação através da levedura *Sporobolomyces ruberrimus*;

- Avaliação do efeito da umidade e temperatura na produção da lipase.

c) Delineamento experimental para otimização da produção das enzimas produzida pelo fungo filamentoso *P. crustosum*;

- Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimização da produção de lipases.
- Planejamento experimental do tipo Plackett-Burman para suplementação dos farelos de soja e de arroz objetivando atingir a otimização da produção de lipase em fermentação em estado sólido.

d) Delineamento experimental para precipitação com sulfato de amônia do extrato enzimático obtido pelo fungo filamentoso *P. crustosum*.

e) Delineamento experimental para otimização da produção das enzimas produzida pela levedura *S. ruberrimus*.

- Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimização da produção de lipases.

-

f) Delineamento experimental para a caracterização do extrato enzimático bruto e precipitado das enzimas produzidas pelo fungo filamentoso *P. crustosum*.

- Determinação da estabilidade da enzima liofilizada, em termos de temperaturas baixas e altas.
- Avaliação da especificidade dos extratos enzimáticos com atividade de esterificação:

Álcoois: Metanol, etanol, n-propanol e butanol

Ácidos: láurico (C12:0) , oleico (C18:1) e butírico (C4:0).

- Estudo do efeito da temperatura e memória de pH da enzima produzida.

3.4 MICRO-ORGANISMOS

3.4.1 Fungo filamentoso *Penicillium crustosum*

O fungo filamentoso *Penicillium crustosum* (Figura 1) foi isolado previamente por Rigo *et al.* (2010). Este fungo foi selecionado como potencial produtor de lipases utilizando-se metodologias de seleção em meios sólido e líquido descritos na literatura (Freire, 1996).



Figura 1- Aspecto do fungo *Penicillium crustosum* semeado em meio PDA.

Manutenção da cepa

As cepas isoladas foram crescidas em meio PDA durante sete dias a 30 °C e então as colônias foram raspadas usando alça de platina e adicionadas em tubos com solução aquosa estéril contendo 50 % de glicerina bi-destilada (87 % pureza), Tween 80 (0,1 % v/v) e NaCl (0,9 % m/v). A solução contendo os esporos foi transferida para criotubos de 1,5 mL estéreis e conservada a -18 °C. A propagação de esporos para posterior fermentação foi feita por um período de sete dias a 27 °C.

3.4.2 Levedura *Sporobolomyces ruberrimus*

Este micro-organismo foi isolado previamente por Griebeler *et al.* (2010), a partir de farelo de soja, como um potencial produtor de lipases, utilizando metodologias de seleção em meio sólido. O micro-organismo foi identificado no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do CENA-USP-Piracicaba como a levedura *Sporobolomyces ruberrimus*.

Manutenção da cepa

Para a manutenção da levedura, esta foi multiplicada em meio PC (% m/v em água destilada 0,5 % de peptona; 0,1 % de dextrose; 0,25 % de extrato de levedura) a 30 °C por 24 h, sendo o meio adicionado em microtubos estéreis de 1,5 mL com glicerol na proporção (1:1). Os tubos foram mantidos em freezer a -18 °C. A levedura também foi conservada em

tubos com PDA inclinado com camada de óleo mineral sob refrigeração. Foram realizados repiques semanais em placas de Petri contendo meio PDA incubando-se a 30 °C por 3 a 5 dias; sendo as placas armazenadas sob refrigeração por até uma semana após a incubação.

Produção de células

Utilizou-se o meio PC descrito previamente para a produção do inóculo. O pré-inóculo foi preparado adicionando o micro-organismo das placas em tubos de ensaio com tampa contendo 10 mL de meio PC previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos. A mistura foi incubada a 25 °C por 24 horas.

O inóculo foi preparado pela adição do pré-inóculo em erlenmeyer de 250 mL, tampado com bucha de algodão contendo 90 mL de meio PC previamente esterilizado. Os frascos foram incubados em agitador orbital (Marconi MA410) a 30 °C e 150 rpm por 24 horas. Esse caldo (inóculo) foi utilizado para a inoculação do meio fermentativo e ajuste da umidade (concentração média de 0,3 g/L de massa celular seca).

3.5 SUBSTRATOS

Os substratos utilizados como suporte no processo fermentativo para a produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) foram: farelo de soja (FS), que consiste no resíduo da extração do óleo de soja, obtido após a prensagem de grãos e extração com solventes, doado por uma indústria de óleo de soja local (Olfar, Erechim, RS); o bagaço de cana de açúcar (BC), um dos subprodutos da indústria da cana (doador por uma destilaria de Erechim); o farelo de arroz (FA), subproduto do processo de beneficiamento do arroz, obtido em uma indústria de parboilização de arroz (Polisul, Santa Vitória do Palmar, RS) e o caroço de algodão (FCA), resíduo da colheita do algodão (cedido por um produtor da Bahia), este substrato foi previamente moído (granulometria de 1-2 mm) antes de ser inoculado. Os substratos foram estocados a temperatura de -15 °C com objetivo de manter as características físico-químicas.

A caracterização dos farelos foi realizada determinando-se a umidade, cinzas, lipídios, nitrogênio (NKT), proteínas, minerais e pH, seguindo metodologia descrita a seguir. A

análise da umidade antecedia cada etapa experimental de fermentação buscando a padronização deste conteúdo no meio.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS E DOS SUPLEMENTOS

Neste item será apresentada a metodologia utilizada na caracterização físico-química dos resíduos agroindustriais utilizados na produção da enzima.

3.6.1 Umidade

Foram pesados 3 g da amostra em cápsula de alumínio. O material contendo a amostra foi aquecido em estufa 105 °C por 3 h, resfriado e pesado; repetindo-se a operação de aquecimento, com duração de meia hora, até obtenção de massa constante. O teor de umidade foi determinado através da Equação 1 e as análises foram realizadas em triplicata.

$$U = \frac{(A_1 - A_2) \times 100}{B} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

U= Umidade (%);

A₁= Massa (inicial) cadinho vazio seco + amostra (g);

A₂= Massa do conjunto (final) amostra + cadinho (g);

B= Massa da amostra (g);

3.6.2 Cinzas

Foram pesados 3 g da amostra em cápsula de porcelana, previamente seca em estufa a 105 °C, até massa constante. O método fundamenta-se na perda de peso que ocorre quando a cápsula como o produto é incubado a 500-550 °C, com a destruição da matéria orgânica, sem decomposição dos constituintes do resíduo mineral ou perda por volatilização (Lanara, 1981). As análises foram realizadas em triplicata e a obtenção do teor de cinzas ocorreu de acordo com:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{Massa cadinho + amostra final (g)} - \text{Massa cadinho inicial (g)} \times 100}{\text{Massa Amostra (g)}}$$

Equação 2

3.6.3 Lipídios

O teor de óleos e graxas dos farelos foi determinado por extração em Soxhlet pelo princípio da extração contínua a quente, utilizando éter petróleo como solvente. O papel de filtro contendo 3 g de amostra foi empacotado e colocado em cartucho de extração previamente seco em estufa a 105 °C por 15 min. O cartucho foi colocado no extrator e iniciava-se a extração com éter petróleo por 6 h em sistema de extração repetida. O solvente foi recuperado e o balão contendo as gorduras extraídas foi seco em estufa a 105 °C por 1,5 h, resfriado em dessecador até temperatura ambiente e, então, pesado. O teor de óleos e graxas foi calculado através da Equação 3.

$$AGT = \frac{(B - A) \times 100}{C}$$

Equação 3

Onde:

AGT=Lipídios Totais (%);

B= Massa do conjunto balão + resíduo de óleos e graxas seco (g);

A= Massa do balão vazio seco (g);

C= Massa da amostra (g).

3.6.4 Nitrogênio

A determinação do teor de Nitrogênio Kjeldahl Total (NKT) foi feita por método padrão (IAL, 1985). A amostra (1 g) foi digerida em meio ácido (12 mL de H₂SO₄ concentrado) na presença de 1 pastilha de 3,5 g de sulfato de potássio e 3,5 g de selênio

durante 4 h. Após neutralização com 40 mL de NaOH (40 % m/v), 75 mL de água destilada foram adicionados. A amônia formada foi destilada e absorvida em 25 mL de ácido bórico (4 % m/v), sendo em seguida titulada com HCl 0,1 M. As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de nitrogênio foi determinada através da Equação 4, sendo que para obtenção do teor de proteína é necessário multiplicar o valor de NKT encontrado pelo fator 6,25.

$$NKT = \frac{14,01 \times Va \times N}{P \times 10} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

NKT= (%) Nitrogênio Kjeldahl total;

Va= Volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL);

N= normalidade da solução de HCl padronizado (0,1N);

P= massa da amostra usada na análise (g).

3.6.5 Proteínas

Para obtenção do o teor de proteína é necessário multiplicar o valor de NKT encontrado pelo fator de correção 6,25, como demonstrado pela Equação 5.

$$Proteína = NKT \times 6,25 \quad \text{Equação 5}$$

3.6.6 Minerais

A partir da obtenção apenas dos constituintes do resíduo mineral (cinzas) dos respectivos substratos caracterizados, foi possível determinar os macro e microminerais presentes nos mesmos.

Os macrominerais (Al, Mg, Ca e K) e microminerais (Fe) foram determinados por espectrometria de absorção atômica em chama – FAAS (Varian Spectra AA – 55), segundo metodologia descrita por AOAC (1995). Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco de Ca, Al, Mg, K e Fe, como fonte de radiação. Os elementos foram medidos em condições de operação

otimizadas por FAAS em chama ar/acetileno ou óxido nitroso/acetileno. As leituras de Ca, Mg, Al, K e Fe foram realizadas no FAAS, no modo absorção. Para eliminar possíveis interferências na determinação de Ca, Mg e Al, foi adicionado cloreto de lantânio (Merck) nas amostras e nas soluções padrão na proporção de 1 % (m/v). Os cálculos dos teores dos minerais nas amostras foram baseados em curva de calibração obtida com as soluções padrão.

3.6.7 Determinação do pH

Para a determinação do pH dos substratos, foram pesados 10 g das amostras, todas em triplicata. Transferiu-se este conteúdo para erlenmeyer, onde 100 mL de água destilada foram adicionadas. Agitou-se por 15 minutos a 160 rpm e 25 °C para homogeneização das partículas à água e após 10 minutos de repouso as mesmas foram filtradas e o pH foi determinado com medidor digital.

3.7 ESTUDO DA PRODUÇÃO DA LIPASE

Neste item será apresentada a metodologia utilizada para a produção de lipases utilizando resíduos agroindustriais por fermentação em estado sólido.

3.7.1 Fermentação em estado sólido (FES)

Os farelos, sem prévia classificação, foram utilizados nas fermentações conduzidas por 120 h em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica, contendo 10 g de farelo seco com umidade ajustada com água destilada, conforme condição estabelecida no planejamento de experimentos (Tabela 6). Após esterilização (121 °C, 15 min) os béqueres foram inoculados e incubados em câmara climatizada (Tecnal TE-410). Para a inoculação dos fungos, utilizou-se 2,5 mL de inóculo com concentração de esporos ajustada para se obter $1,0 \cdot 10^8$ esporos/g de farelo seco (Rigo *et al.*, 2010), incubando-se a 30 °C.

Inóculo

a) Fungo Filamentoso *Penicilium crustosum*

O meio para produção do inóculo do fungo constituiu de frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio (PDA). O meio esterilizado foi inoculado com 0,5 mL de suspensão de esporos obtida a partir de estoques, sendo então incubado por 7 dias a 27 °C. A coleta dos esporos foi realizada adicionando-se 10 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1 % v/v) e pérolas de vidro estéreis ao frasco para uma melhor remoção dos mesmos.

A suspensão resultante foi armazenada a 4 °C até sua utilização, por um tempo máximo de 15 dias. Para contagem dos esporos, 1 mL da suspensão era retirado assepticamente e diluído de 10 a 1000 vezes em solução aquosa estéril de Tween 80 (0,1 % v/v). A suspensão resultante foi transferida para câmara de Neubauer (Prolab) para contagem dos esporos. A concentração da suspensão foi ajustada para se alcançar $1,0 \cdot 10^8$ esporos/g de substrato seco (Rigo *et al.*, 2010).

b) Levedura *Sporolomyces ruberrimus*

O crescimento microbiano foi determinado em termos de concentração de biomassa (g/L). Foram adicionados 1 mL de caldo fermentado (triplicata) em tubos de polipropileno de 1,5 mL e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de água destilada e centrifugado novamente, sendo esse procedimento repetido duas vezes. A densidade óptica foi monitorada em 650 nm (Espectrofotômetro Agilent 8453). Relacionou-se massa celular seca e densidade óptica a 650 nm.

Estudo da suplementação dos farelos utilizados na otimização da produção de lipases a partir do *P. crustosum*

Os suplementos testados foram o óleo de soja (OS), óleo de arroz (OA), azeite de oliva (AO), água de maceração de milho (AMM), melaço de cana de açúcar (MC) e uréia (U).

Para a realização das suplementações foram preparadas emulsões com água deionizada e a concentração do respectivo suplemento, homogeneizando-se com mixer por 3 minutos, levando-se em consideração os níveis avaliados no planejamento de experimentos.

O ajuste de umidade foi realizado com água destilada estéril, levando-se em consideração a quantidade de água presente no inóculo e a umidade natural dos farelos brutos. As emulsões foram adicionadas por gotejamento manual com auxílio de pipetador, de forma que toda a área do farelo fosse recoberta, melhorando assim a homogeneidade do meio. A umidade do meio foi ajustada conforme planejamento fatorial. Os béqueres foram então fechados com manta acrílica e autoclavados a 121 °C por 15 min.

Após a esterilização, procedeu-se a inoculação do farelo com uma suspensão de esporos dos micro-organismos, padronizando-se a suspensão em $1,0 \cdot 10^8$ esporos/g farelo seco. Os béqueres foram incubados em câmara a 30 °C, com injeção de ar úmido, de forma a manter a umidade relativa do ar no interior da câmara maior que 90 %.

A avaliação do comportamento cinético da suplementação do farelo na produção de lipase com atividade de esterificação foi realizada por fermentações em triplicata de experimentos, com retirada de amostras destrutivas do material fermentado em intervalos regulares de 48 horas de fermentação na mesma câmara de incubação.

Cinética da produção de lipase

A primeira etapa realizada neste trabalho consistiu em um ensaio cinético de produção de lipase para cada substrato testado. O *Penicillium crustosum* foi inoculado inicialmente em farelo de soja, de arroz e de caroço de algodão moído, baseando-se nas condições estabelecidas por Vargas *et al.* (2008), a levedura *Sporolomyces ruberrimus* foi inoculada em farelo de soja, de arroz e bagaço de cana. A atividade lipásica para cada substrato foi monitorada ao longo de 120 horas de fermentação a 20, 30 e 40 °C. A fermentação foi realizada em duplicata, com béqueres contendo 10g dos respectivos substratos, com umidade de 55 %. Após este ensaio prévio, estudou-se a otimização da produção com quatro substratos (farelo de arroz, de soja, caroço de algodão e bagaço de cana).

Otimização da produção de lipase

De acordo com os resultados obtidos na cinética da produção, a avaliação da produção de lipase por *P. crustosum* foi realizada em 48 e 72 horas de fermentação para cada um dos substratos: farelo de arroz e de soja, caroço de algodão moído e bagaço de cana de açúcar. A otimização da produção de lipase por *S. ruberrimus* foi realizada em 48 horas de fermentação para farelo de soja e farelo de arroz e em 72 horas de fermentação para bagaço de cana. A umidade e temperatura da fermentação foram avaliadas como variáveis independentes e a atividade lipásica do extrato enzimático liofilizado, como resposta (variável dependente). Para que as condições de produção de lipases fossem otimizadas, utilizou-se a técnica de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta.

Segundo Rodrigues e Iamma (2005) a técnica de planejamento de experimentos é uma ferramenta estatística que permite determinar os fatores que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, assim como avaliar as possíveis inter-relações entre as variáveis de um processo. Além disso, permite otimizar o sistema em estudo, com o objetivo de maximizar ou minimizar uma determinada resposta.

Após testes preliminares, Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais 2^2 (DCCR), um para cada substrato, foram realizados variando a umidade (50, 60 e 70 %), do meio fermentativo e a temperatura de incubação em câmara climatizada (20, 30 e 40 °C). A Tabela 6 apresenta as variáveis e a faixa de estudo para os delineamentos experimentais realizados. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata e a resposta avaliada em todos os experimentos foi a atividade enzimática de esterificação. Os resultados foram avaliados por meio do software Statistica 5.0 (StatSoft, Inc., 2001).

Tabela 7- Variáveis e níveis estudados no primeiro planejamento fatorial completo para cada substrato e para o fungo filamentoso *P. crustosum* e a levedura *S. ruberrimus* em 48 h de fermentação

Variável	Níveis		
	-1	0	1
Umidade (%)	50	60	70
Temperatura (°C)	20	30	40

Após o tratamento estatístico para conhecimento das variáveis que possuem efeito significativo na produção de lipase, partiu-se para suplementação de dois substratos potenciais, definidos na etapa anterior, para serem conduzidos os experimentos posteriores para a otimização da produção de lipases obtidas a partir do *P. crustosum*. Utilizou-se o farelo de soja e o de arroz com seis suplementos (azeite de oliva (AO), óleo de arroz (OA), óleo de soja (OS), água de maceração de milho (AMM), melação de cana de açúcar (MC) e uréia (U)). Para tal, aplicou-se o planejamento de experimentos do tipo Plackett-Burman (PB) com 15 ensaios, visando uma seleção inicial das variáveis que afetam o processo.

Durante esses novos planejamentos, a umidade foi fixada em 60%, a temperatura em 30 °C e tempo de fermentação em 48 horas. Os níveis e os referidos fatores (umidade e concentração do suplemento) que foram investigados nos planejamentos de experimentos são apresentados na Tabela 7. O primeiro planejamento foi realizado utilizando farelo de soja e o segundo planejamento utilizando farelo de arroz como substrato, ambos com o micro-organismo *P. crustosum*.

Tabela 8-Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental PB para avaliação do efeito da suplementação dos substratos farelo de soja e farelo de arroz utilizados para produção de enzimas obtidas pelo fungo filamentoso *P. crustosum*

Variável	Níveis		
	-1	0	1
AO (% p/p)	0	0,5	1
OA (% p/p)	0	0,5	1
OS (% p/p)	0	0,5	1
AMM (% p/p)	0	2	4
MC (% p/p)	0	2	4
U (% p/p)	0	1	2

A análise do planejamento experimental PB indicou a necessidade de novos planejamentos para a otimização da produção de lipases obtidas pelo fungo filamentoso *P. crustosum*. Para o próximo planejamento utilizando farelo de soja como substrato foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com duas variáveis independentes (AO e U), adicionando-se pontos axiais e para o planejamento utilizando farelo

de arroz como substrato foi realizado um DCCR com três variáveis independentes (AO, OS e AMM) e com pontos axiais, conforme níveis demonstrados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 9-Variável e níveis estudados no planejamento DCCR para otimização da produção da lipase utilizando farelo de soja como substrato e o fungo filamentoso *P. crustosum*

Variável	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
AO (% p/p)	0	0,4	1,5	2,6	3
U (% p/p)	1	2,3	5,5	8,7	10

Tabela 10-Variável e níveis estudados nos planejamento DCCR para otimização da produção da lipase utilizando farelo de arroz como substrato eo fungo filamentoso *P. crustosum*

Variável	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
AO (% p/p)	0	0,4	1,5	2,6	3
OS (% p/p)	0	0,4	1,5	2,6	3
AMM (% p/p)	1	2,3	5,5	8,7	10

Através da análise estatística foi possível encontrar as condições otimizadas da produção da enzima a partir do fungo filamentoso *Penicillium crustosum*, no processo de fermentação em estado sólido utilizando farelos de arroz e de soja como substrato e diferentes suplementos.

Processo de extração da enzima

O processo de extração foi realizado em Erlenmeyeres de 250 mL, onde ao meio fermentado foi adicionado tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 na razão 1:5 (10 g de meio fermentado para 50 mL de tampão). Estes frascos foram incubados por 20 min a 35 °C e 200 rpm em agitador orbital. Após a incubação, as amostras foram filtradas, utilizando-se tecido de nylon e pressão manual obtendo-se o extrato enzimático bruto (Vargas *et al.*, 2008).

A atividade enzimática de esterificação foi determinada segundo procedimento descrito no item 3.8. Todas as determinações foram realizadas em duplicata. Cabe ressaltar que a determinação da atividade de esterificação deve ocorrer em sistema com baixo conteúdo de umidade. Assim, foi necessário realizar a desidratação do extrato aquoso obtido após o processo de extração da enzima da matriz sólida. Para tanto, foi empregado o processo de liofilização.

Os extratos foram dispostos em camadas de 1 cm de espessura em placas de Petri e então submetidos ao congelamento a -80 °C por 24 h, como fase preparatória do procedimento de liofilização (Persson *et al.*, 2002). As amostras foram então levadas ao liofilizador, onde através do processo de sublimação em condições de vácuo, a água livre presente no congelado foi removida.

A umidade residual dos extratos liofilizados foi determinada em sistema Karl Fisher, sendo que o teor de água dos extratos enzimáticos não ultrapassou 12 %. As amostras secas foram acondicionadas em frascos de vidro, lacrados, codificados e vedados com Parafilm[®], sendo armazenadas sob refrigeração (4 °C) até o momento de realização das análises.

3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ESTERIFICAÇÃO

A atividade de esterificação do extrato enzimático bruto liofilizado foi quantificada através da reação de síntese do ácido oleico e etanol (razão molar 1:1) (Langone *et al.*, 2002; Bernardes *et al.*, 2007, modificado). A reação foi conduzida a 40 °C, 160 rpm por 40 min. Esta foi iniciada pela adição do extrato liofilizado (0,1 g) ao meio reacional, em frascos de vidro com tampa, mantidos em agitador orbital. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata no início da reação. A cada amostra foram adicionados 20 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação e para extração do ácido oleico.

A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com NaOH 0,035 M. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada utilizando a Equação 6.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \cdot M_{EL} \times V_c}$$

Equação 6

Onde:

AE = atividade de esterificação (U/g);

V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min (mL);

V_b = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo 0 (mL);

M = molaridade da solução de NaOH;

V_f = volume final de meio reacional (mL);

t = tempo (min);

M_{EL} = massa da preparação enzimática liofilizada utilizada na reação (g);

V_c = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

3.9 CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO PRECIPITADO OBTIDO A PARTIR DO FUNGO FILAMENTOSO *P. crustosum*

O ensaio de precipitação foi realizado com a adição de 150 mL do extrato enzimático bruto em um béquer de 500 mL onde foi acrescentado o sulfato de amônio (Vetec) até a concentração desejada da condição de saturação. O béquer contendo a mistura foi mantido a 4 °C em banho de gelo, com agitação constante, controlando-se o pH em 7,0 com adição de NaOH 20 %, de acordo com metodologia adaptada por Menoncin *et al.* (2009).

O extrato enzimático acrescido do sal foi transferido para tubos de centrífuga e mantido a -10 °C durante 5 h. Transcorrido este tempo, o mesmo foi centrifugado (4 °C; 5400 x g durante 30 minutos), possibilitando a separação da fração protéica. O sobrenadante foi descartado e o precipitado removido com quantidade mínima de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (Menoncin *et al.*, 2009).

As amostras foram então congeladas a -80 °C e liofilizadas por 48 horas para posterior medição da atividade enzimática de esterificação.

A Tabela 10 demonstra as variáveis e níveis estudados no planejamento de experimentos para a análise da porcentagem de saturação, aplicadas no processo de

precipitação das enzimas obtidas a partir do fungo filamentoso estudado no presente experimento.

Tabela 11- Variáveis e níveis estudados no planejamento DCCR para o processo de precipitação da lipase utilizando farelo de soja e de arroz como substrato e o fungo filamentoso *P. crustosum*

Variável	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
% saturação	32	40	60	80	88
Temp (h)	5	6	9	12	13

3.10 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO E CONCENTRADO OBTIDOS A PARTIR DO FUNGO FILAMENTOSO *P. crustosum*

As lipases produzidas pelo fungo filamentoso *P. crustosum* (a partir dos diferentes substratos) foram parcialmente caracterizadas em relação à especificidade aos substratos de esterificação, à estabilidade em temperaturas altas e baixas e ao comportamento frente a diferentes memórias de pH e temperaturas.

3.10.1 Especificidade aos substratos de esterificação

A especificidade das lipases produzidas com os diferentes substratos (farelo de soja e farelo de arroz) em relação a atividade enzimática de esterificação foi avaliada. A atividade lipásica foi medida para atividade de esterificação, utilizando-se como ácidos graxos: os ácidos oléico, butírico e láurico, e como álcoois: o metanol, etanol, propan-1-ol e butan-1-ol nas proporções molares de 1:2 (ácido graxo:álcool).

Para a aplicação das lipases com propósitos analíticos ou industriais a especificidade é extremamente importante (Castro e Anderson, 1995). A especificidade ao substrato vem sendo intensamente investigada em sistemas reacionais bifásicos e meios reacionais

orgânicos. Modelos cinéticos usualmente baseados na aplicação das suposições de Michaelis-Menten foram propostos, como aqueles que empregam um fator de competição para expressar a especificidade ao substrato (Peter e Preda, 2002).

A especificidade ao substrato de lipases em reações de esterificação é importante para obter um melhor entendimento da relação estrutura-função e melhorar os parâmetros reacionais, proporcionando maiores conversões e aplicabilidade (Peter e Preda, 2002). Dependendo das características de especificidade da lipase, esta pode se tornar atraente para diferentes aplicações em áreas industriais potenciais (Sun e Xu, 2009).

3.10.2 Estabilidade em diferentes temperaturas

3.10.2.1 Estabilidade em altas temperaturas

Para a determinação da estabilidade térmica das lipases produzidas em diferentes substratos (FA e FS), as amostras liofilizadas foram incubadas em diferentes temperaturas (35, 45 e 60 °C). A atividade de esterificação foi monitorada até a perda total de atividade em intervalos de 24 horas.

3.10.2.2 Estabilidade em baixas temperaturas e temperatura ambiente

Foram armazenadas amostras das enzimas produzidas utilizando os substratos FS, e FA em refrigerador (4 °C), freezer (-10 °C) e em temperatura ambiente. A atividade lipásica (esterificação) de cada uma das enzimas foi medida a cada 10 dias, a fim de monitorar a estabilidade das mesmas em diferentes temperaturas de armazenamento.

3.10.2.3 Efeito da temperatura e memória de pH na atividade lipásica

As enzimas produzidas foram pré-incubadas em diferentes tampões de pH (de 3,0 a 10,0) por 20 minutos a 4 °C e liofilizadas, de acordo com a metodologia descrita por Sun e Xu (2009). A atividade de esterificação das amostras foi medida em diferentes temperaturas

(de 11,8 a 68,2 °C). Os efeitos do pH e temperatura nas lipases produzidas a partir dos diferentes substratos foram avaliados por meio de DCCR 2². A Tabela abaixo apresenta os níveis de pH e temperatura nos quais o comportamento de cada uma das lipases produzidas pelo fungo filamentoso *P. crustosum*, foi avaliado.

Tabela 12- Variáveis e níveis investigados na avaliação do efeito temperatura e da memória de pH na atividade enzimática de esterificação

Variável	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
pH	3	4	6,5	9	10
Temperatura (°C)	11,8	20	40	60	68,2

CAPÍTULO 4

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos, os resultados referentes a caracterização dos substratos utilizados no decorrer do experimento, bem como os resultados referentes à otimização e caracterização da produção de lipases por FES utilizando diferentes substratos (farelo de soja, farelo de arroz, caroço de algodão moído e bagaço de cana) e suplementos (azeite de oliva, óleo de soja, óleo de arroz, água de maceração de milho, melaço de cana e uréia), a caracterização parcial do extrato bruto, e ainda a caracterização parcial do extrato precipitado e o fungo filamentoso *P. crustosum*. Neste capítulo também serão apresentados os resultados e a discussão referentes a otimização de lipases obtidas pela levedura *S. ruberrimus* em FES. Para alcançar tal objetivo a técnica do planejamento seqüencial de experimentos foi utilizada.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS

A seleção de um substrato é a chave da fermentação em estado sólido. O material sólido não solúvel pode atuar apenas como suporte físico ou ainda exercer a função de fonte de nutrientes (substrato) para a cepa. O sólido pode ser de origem natural, como produtos agrícolas, resíduos agroindustriais ou ser constituído por um suporte inerte suplementado com os nutrientes necessários à FES (Christen *et al.*, 1997; Pintado *et al.*, 1998; Dominguez *et al.*, 2003; Pandey, 2003). As Tabelas 12 e 13 apresentam, respectivamente, os resultados da caracterização dos substratos e suplementos utilizados neste trabalho. Na produção de enzimas, as tortas e farelos são usados como substratos para FES ou como suplemento do meio de produção, em termos de fonte carbono e nitrogênio (Ramachandran *et al.*, 2007).

De acordo com a análise da composição dos substratos (Tabela 12), os mesmos apresentam diferenças consideráveis quanto aos teores de cinzas, umidade, proteína,

nitrogênio, lipídios e minerais sendo que o farelo de caroço de algodão mostrou-se com maior concentração de lipídios e o farelo de soja maior concentração de nitrogênio e proteínas. Teores menores de cinzas foram obtidos para bagaço de cana, o qual apresentou também uma tendência de menores concentrações de minerais.

Quanto ao pH observou-se que os do farelos de arroz, de soja e caroço de algodão apresentam valores próximos à neutralidade. O bagaço de cana, no entanto, apresenta pH mais ácido.

Os teores de umidade obtidos para cada substrato foram levados em consideração nos ajustes de umidade dos meios durante os experimentos realizados em FES.

Tabela 13- Caracterização química dos substratos utilizados na FES para produção de lipases

Substrato	Umid (%)	Cinz. (%)	Lip. (%)	Nit. (%)	Prot. (%)	Minerais (mg/100g)					pH
						Fe	K	Mg	Ca	Al	
BC	7,73	1,92	0,63	0,37	2,36	18,55	304,5	64,78	46,93	11,15	4,3
FA	11,79	9,09	16,43	2,07	12,95	6,19	2041,93	1074,14	56,99	4,35	6,9
FCA	6,48	3,72	19,59	3,59	22,43	0,41	1272,71	381,13	114,44	-	5,9
FS	13,62	5,6	2,89*	6,96*	42,5*	66,35	344,5	951,00	-	23,7	6,7

*Rigo (2009).

Onde:

BC = bagaço de cana; FA= farelo de arroz; FCA= farelo caroço de algodão; FS= farelo de soja.

Tabela 14- Caracterização química dos suplementos utilizados para produção de lipases obtidas a partir do *P. crustosum* em FES de farelo de soja e de arroz

Suplemento	Lipídios (%)	Umidade (%)	Carbono (%)	Nitrogênio (%)
OS	100	0	79,2	0,04
MC	0,7	39	31,92	0,5
AMM	0,6	59	18,7	3,4
U	0	0	20	46,64
AO	100	0	75,77	2,61
OA	100	0	-	-

Onde:

OS= Óleo de soja; MC= melaço de cana; AMM= água de maceração de milho; U= uréia; AO= azeite de oliva; OA= óleo de arroz.

Ao se comparar a composição dos substratos utilizados neste estudo com outros substratos provenientes da agroindústria observa-se que o teor de nitrogênio do farelo de soja e lipídios do farelo de arroz é superior aos teores de outras tortas como a de babaçu e mamona, caracterizados por Silva (2010). O mesmo autor avaliou ainda o pH desses substratos que variaram entre 7 e 8 para mamona e entre 6,5 e 7,5 para babaçu. A produção de cepas de *Rhizopus* sp. foi favorecida quando o substrato usado para a bioconversão foi o bagaço de mandioca, devido aos seus baixos valores de minerais e cinzas (Pandey e Soccol, 2001). Alguns autores citam que a presença de íons cálcio e sódio no meio favoreceram o aumento da atividade enzimática (Germano *et al.*, 2003).

Na produção de enzimas, as tortas e farelos são usados como substratos para FES ou como suplemento do meio de produção, em termos de fonte de carbono e nitrogênio (Ramachandran *et al.*, 2007). A produção de lipases pode ser induzida por diferentes substratos lipídicos, mas o mecanismo envolvido ainda está sob investigação. O papel destes substratos na sua síntese e secreção ainda está pouco esclarecido (Wang *et al.*, 2008).

A partir da caracterização química das matérias primas utilizada no experimento, optou-se por suplementar os substratos farelo de soja e de arroz, pois são resíduos agroindustriais encontrados em abundância no Rio Grande do Sul.

A literatura relata que a suplementação do meio com lipídios, em alguns casos, não é eficiente. Ao adicionar outras fontes de carbono complementar, ocorre a redução da produção, o que é atribuído à repressão catabólica pela fonte de carbono disponível no meio de cultura (Kamini *et al.*, 1998).

Neste contexto, após a caracterização dos substratos e suplementos, realizou-se um estudo sistemático dos diferentes resíduos agroindustriais, com suplementação, a fim de investigar a otimização da produção de lipases com o uso do fungo filamentoso *Penicillium crustosum* e da levedura *Sporobolomyces ruberrimus* como uma alternativa de baixo custo.

4.2 PRODUÇÃO DE LIPASE EM FES OBTIDAS PELO FUNGO FILAMENTOSO *P. crustosum*, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO PRECIPITADO

4.2.1 Avaliação da produção de lipase a partir de *Penicillium crustosum* em diferentes substratos

Como uma primeira etapa na consecução deste trabalho foi realizada um ensaio da produção de lipase, visando a seleção dos substratos que seriam usados durante o trabalho, bem como as condições de fermentação e tempo, conforme demonstra a Figura 2. Observa-se que atividades de esterificação do *Penicillium crustosum* por FES mais elevadas foram de 152,46 (em 72 h); 174,80 (em 48 h) e 112,28 (em 48 h) U/g de substrato seco (gss) para farelo de algodão, farelo de soja e farelo de arroz, respectivamente.

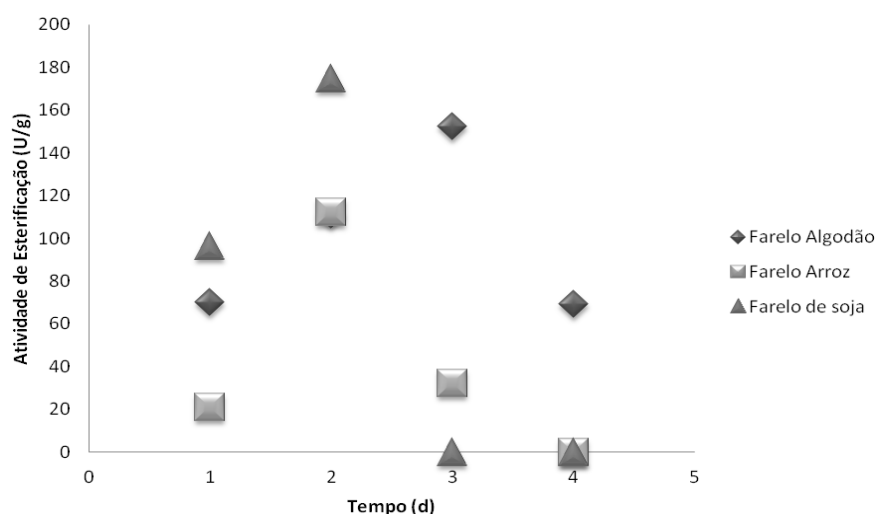


Figura 2- Avaliação da produção de lipase ao longo de 5 dias de fermentação a 27 °C e umidade 55 %, usando como substratos farelo de algodão, farelo de arroz e farelo de soja e resposta em termos de atividade de esterificação do extrato enzimático bruto.

Kamini *et al.* (1998), estudando a produção de lipase por cepas de *Aspergillus niger* MTCC 2594 por fermentação em estado sólido usando bagaço de gengerlim encontraram atividade lipolítica de 363,6 U/g de substrato seco em 72 h. Martins *et al.* (2008) encontraram

a atividade lipolítica máxima para o fungo *Phialemonium* sp. de 129,50 U/g, utilizando aeração de 60 mL/g.h e óleo de soja como fonte de carbono adicional. Estes mesmos autores encontraram para o fungo *Aspergillus fumigatus* a atividade lipolítica máxima de 119,46 U/g, utilizando aeração de 60 mL/g.h e óleo de soja como fonte de carbono adicional. Kempka *et al.* (2008), investigando a produção lipase por *Penicillium verrucosum*, encontraram uma atividade enzimática de cerca de 40 U/grama de substrato seco. Cabe salientar que todos estes resultados referem-se à atividade de hidrólise do extrato enzimático bruto.

De acordo com os resultados obtidos na cinética de produção da lipase utilizando os diferentes substratos, onde os melhores resultados foram obtidos em 48 e 72 horas, partiu-se para a otimização da produção da enzima, quantificada em termos de atividade de esterificação.

4.2.2 Otimização da produção da lipase em termos de atividade de esterificação

A partir dos resultados obtidos na etapa de avaliação da cinética da produção com os diferentes substratos, partiu-se para a consecução da otimização do processo em termos de atividade de esterificação em diferentes substratos e o fungo filamentoso *P. crustosum*, utilizando 48 e 72 horas de fermentação em estado sólido.

A Tabela 14 apresenta os valores de atividade de esterificação obtida na FES com resíduos agroindustriais e com o fungo filamentoso *P. crustosum* em 48 h de fermentação.

Pode-se observar que a atividade de esterificação máxima obtida para os quatro substratos testados ocorreu no ponto central. Para o farelo de soja, a atividade foi de 116,30 U/g; para o de arroz de 136,16 U/g; para o de caroço de algodão foi de 192, 93 U/g e para o bagaço de cana foi de 107,96 U/g. O bagaço de cana foi o substrato que menor atividade apresentou, fato relacionado à sua composição, mais deficiente em nutrientes em relação aos outros substratos.

Para o farelo de soja a menor atividade lipásica foi encontrada no ensaio 3 (U=50 % e 40 °C) seguida do ensaio 4. Para o farelo de arroz a menor atividade foi observada no ensaio 1 seguida do ensaio 3. Para o farelo obtido a partir do caroço de algodão, menores atividades foram obtidas no ensaio 2 e para o bagaço de cana no ensaio 4.

Tabela 15- Matriz do DCCR 2² com valores reais e codificados e as respostas da atividade de esterificação com *P. crustosum* em 48 h de FES para cada um dos substratos testados

Ensaio	Umidade (%)	Temperatura (°C)	AE (U/g)			
			48 h de fermentação			
			Substrato			
			FS	FA	FCA	BC
1	50 (-1)	20 (-1)	97,15	63,34	83,53	55,24
2	70 (1)	20 (-1)	90,09	73,15	76,31	40,16
3	50 (-1)	40 (1)	61,85	69,91	77,83	46,52
4	70 (1)	40 (1)	72,86	88,70	100,04	39,09
5	60 (0)	30 (0)	108,97	127,34	151,65	107,96
6	60 (0)	30 (0)	112,64	136,16	192,93	94,96
7	60 (0)	30 (0)	116,30	118,53	177,46	81,95

Estes resultados podem estar relacionados ao fato de que os micro-organismos tendem a secretar maiores quantidades de enzima nos níveis intermediários de umidade e em temperaturas intermediárias, seguidas das menores. Isso pode ser atribuído à dificuldade de transferência de massa e calor em altos níveis de umidade. O efeito da temperatura na fermentação observado, pode estar relacionado ao fato de que uma maior temperatura ocasiona uma elevada queda de umidade no meio. Como já observado por outros autores, extremos de temperatura e umidade reduzem a produção de lipases (Kamini *et al.*,1998).

Rodrigues *et al.* (2006) avaliaram a FES do bagaço de cana de açúcar para produção de lipase em umidade de 75 %. Os autores alcançaram bons resultados de produtividade. Outros trabalhos como o realizado por Godoy *et al.* (2009) indicaram que a produtividade aumenta quando a atividade de água está alta, e diminui quando esta decresce ao longo do processo fermentativo.

A Tabela 15 apresenta a matriz do DCCR 2² com valores reais e codificados e as respostas da atividade de esterificação com *P. crustosum* em 72 h de FES para o farelo de soja e para o farelo de arroz.

Tabela 16- Matriz do DCCR 2² (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de esterificação com *P. crustosum* em 72 h de FES

Ensaio	Umidade (%)	Temperatura (°C)	AE (U/g)			
			72 h de fermentação			
			Substrato			
			FS	FA	FCA	BC
1	50 (-1)	20 (-1)	149,42	80,78	60,24	58,00
2	70 (1)	20 (-1)	133,19	68,41	80,64	69,35
3	50 (-1)	40 (1)	118,44	52,57	87,34	76,60
4	70 (1)	40 (1)	107,54	138,86	73,86	92,78
5	60 (0)	30 (0)	155,73	151,62	158,06	111,37
6	60 (0)	30 (0)	164,02	130,70	158,68	109,96
7	60 (0)	30 (0)	203,94	172,54	157,43	108,55

Observa-se que a atividade de esterificação máxima obtida em 72 h também ocorreu no ponto central, para todos os substratos estudados, mas não houve diferença significativa quando comparado aos outros ensaios, nesse tempo de fermentação. Observa-se que nesse tempo de estudo as atividades de esterificação foram superiores aos valores encontrados em 48 h de fermentação (Tabela 14). Estes resultados assemelham-se aos de Silva (2010), que estudando a otimização do processo de FES com *Penicillium brevicompactum* em torta de babaçu, observou a atividade de esterificação maximizada em 72 horas de fermentação (244,17 U/g), 30 °C, 70 % de umidade e suplementação de 2 % de óleo de soja. Por outro lado, esses resultados diferem dos encontrados por Di Luccio *et al.* (2004) que observou queda na atividade enzimática em 72 h devido à ação proteásica. As menores atividades lipásicas obtidas em 72 h foram de 107,54; 52,57; 60,24 e 58,00 U/g de substrato seco para o FS, FA, FCA e BC, respectivamente.

Os melhores resultados em termos de atividade de esterificação (U/g) foram obtidos com farelo de soja, farelo de arroz e farelo de caroço de algodão. A partir desses resultados e por serem encontrados em abundância no Rio Grande do Sul, optou-se por suplementar os farelos de soja e de arroz como próxima etapa de consecução do experimento.

4.2.3 Suplementação dos farelos de soja e arroz

Após análise estatística dos planejamentos citados acima, foi realizado o estudo da suplementação de dois substratos bastante promissores em termos de atividade de esterificação (FA e FS) com seis diferentes suplementos: azeite de oliva (AO), óleo de soja (OS), óleo de arroz (OA), água de maceração de milho (AMM), melaço (MC) e uréia (U). Estes substratos (FS e FA) foram selecionados visando incremento na atividade enzimática, sendo encontrado na região Sul do Brasil em abundância e muitas vezes são direcionados como resíduos agroindustriais destinados a alimentação animal.

A literatura relata que a suplementação do meio com lipídios em alguns casos não é eficiente. Ao adicionar outras fontes de carbono complementares, pode ocorrer a redução da produção devido à repressão catabólica pela fonte de carbono disponível no meio de cultura (Kamini *et al.*, 1998). Isto pode ser observado no caso do uso do farelo de caroço de algodão, o qual, devido à sua composição, não apresentou necessidade de suplementação apesar de ter apresentado boa atividade em 48h de fermentação bem como em 72 h, sendo equivalente ao FA. Em relação ao bagaço de cana, decidiu-se por não dar continuidade ao estudo, devido à relativa baixa atividade enzimática obtida.

Nestes experimentos foram fixadas as condições de umidade de 60 %, temperatura de 30 °C e 48 h de fermentação).

Farelo de soja como substrato

A apresentação de uma região ótima de produção é de extrema importância sob a ótica industrial, pois permite que a produção da enzima seja realizada em uma faixa de concentração dos componentes do meio, permitindo oscilações destas no processo, dentro da área estudada

Takaç e Marul (2008) relatam que o tempo necessário para atingir a produção máxima de lipase é dependente do tipo de óleo vegetal usado como suplemento. Contudo, observam que um maior aumento do tempo da fermentação leva à queda da atividade lipásica, independentemente do óleo vegetal usado. Este comportamento foi atribuído à atividade proteásica.

A Tabela 16 demonstra a matriz do planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (PB) com valores reais e codificados das variáveis e as respostas de atividade de esterificação em 48h com diferentes suplementos no farelo de soja.

O PB permite avaliar os efeitos principais e indicações das variáveis que devem ser incluídas no planejamento seguinte e as novas faixas que devem ser estudadas para cada variável a fim de se obter a maximização dos resultados (Rodrigues *et al.*, 2005).

Tabela 17- Matriz do planejamento experimental Placket-Burman com valores reais e codificados das variáveis e as respostas de atividade de esterificação em 48 h com diferentes suplementos no farelo de soja

Ensaio	AO (%p/p)	OS (%p/p)	OA (%p/p)	AMM (%p/p)	MC (%p/p)	U (%p/p)	AE (U/g)
1	(1) 1	(0) -1	(1) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	152,50
2	(1) 1	(1) 1	(0) -1	(4) 1	(0) -1	(0) -1	88,56
3	(0) -1	(1) 1	(1) 1	(0) -1	(4) 1	(0) -1	124,37
4	(1) 1	(0) -1	(1) 1	(4) 1	(0) -1	(2) 1	238,38
5	(1) 1	(1) 1	(0) -1	(4) 1	(4) 1	(0) -1	214,61
6	(1) 1	(1) 1	(1) 1	(0) -1	(4) 1	(2) 1	132,35
7	(0) -1	(1) 1	(1) 1	(4) 1	(0) -1	(2) 1	92,52
8	(0) -1	(0) -1	(1) 1	(4) 1	(4) 1	(0) -1	146,49
9	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(4) 1	(4) 1	(2) 1	128,15
10	(1) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(4) 1	(2) 1	228,27
11	(0) -1	(1) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(2) 1	186,03
12	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	198,16
13	(0,5) 0	(0,5) 0	(0,5) 0	(2) 0	(2) 0	(1) 0	84,30
14	(0,5) 0	(0,5) 0	(0,5) 0	(2) 0	(2) 0	(1) 0	83,72
15	(0,5) 0	(0,5) 0	(0,5) 0	(2) 0	(2) 0	(1) 0	96,26

Observa-se que através da suplementação do farelo de soja com adição de AO a 1 % (p/p), OA a 1 % (p/p), AMM a 4 % (p/p) e 2 % (p/p) de uréia, obteve-se atividade de esterificação de 238,38 U/g observando um incremento quando comparado ao farelo de soja puro que foi de 198,16 U/g. Ferraz *et al.* (2010) observaram as maiores atividades de

esterificação (174,80 U/g de substrato seco (gss)) do *Penicillium crustosum* por FES utilizando farelo de soja puro como substrato. Rigo *et al.* (2010), pesquisando os micro-organismos *Penicillium* P58 e P74 mostraram a possibilidade de produção de lipases com diferentes características alcalinas e ácidas. Em farelo de soja suplementado com uréia e óleo de soja, estes micro-organismos produziram 139,2 e 140,7 U/g de substrato seco em 48 h de fermentação, em condições de extração ácidas e alcalinas, respectivamente.

Na Tabela 17 encontram-se os efeitos das variáveis de processo, estudadas no planejamento experimental PB para a produção de lipase após 48 h de fermentação.

Tabela 18- Efeito das variáveis de processo estudadas no planejamento experimental Plackett- Burman (PB) na produção de lipase após 48 h de fermentação no farelo de soja

	Efeito	Desvio	t(2)	p
Média	146,31*	1,82	80,03	0,0001
(1) AO	29,82*	4,08	7,29	0,0182
(2) OS	-42,25*	4,08	-10,33	0,0090
(3) AO	-26,19*	4,08	-6,40	0,0230
(4) AMM	-18,82*	4,08	-4,60	0,0440
(5) MC	3,01	4,08	0,73	0,5370
(6) U	13,50*	4,08	3,30	0,0800

*Efeito significativo $p < 0,1$

De acordo com a Tabela 17 os suplementos que apresentaram resultados significativos positivos com 90 % de significância foram azeite de oliva e uréia, provavelmente os outros suplementos causaram efeito de inibição sobre o fungo. A adição de óleo de soja ao farelo de soja apresentou efeito significativo negativo ($p < 0,1$), provavelmente por excesso de substrato, causando supressão metabólica ao micro-organismo. Segundo Di Luccio *et al.* (2004) a suplementação de torta de soja com óleo de soja, com o uso do fungo *Penicillium simplicissimum* também não causou aumento da produção de lipase. Tal comportamento atribui-se ao fato do farelo de soja se constituir em boa fonte de nutrientes, provocando inibição enzimática por excesso de substrato.

Rigo *et al.* (2009), avaliando a cinética do processo fermentativo utilizando *Penicillium* sp., mostraram que a suplementação melhorou o meio de produção da enzima.

Uma ótima produção de lipase foi encontrada no farelo de soja suplementado com 6 g/kg de uréia e óleo de soja (C/N 6,11), em diferentes pH, a uma temperatura de 20 °C. Resultados semelhantes foram encontrados por Gombert *et al.* (1999), que estudaram a produção de lipase por *Penicillium restrictum* em torta de babaçu suplementada com peptona e óleo de oliva e demonstraram que as maiores atividades foram obtidas em meio com óleo de oliva (30,3 U/g) e peptona (27,8 U/g) em 24 horas.

De acordo com Rodrigues *et al.* (2006) a produção de lipase extracelular de *R. homothallicus* foi melhorada através da modificação dos meios de nutrientes. Os nutrientes que mais influenciaram o crescimento microbiano e a produção de lipase foram a uréia, o azeite de oliva e diversos oligoelementos. Um máximo de 826 U/g de matéria seca foi obtido em apenas 12 h de incubação. Essa produção representou um aumento de 60 vezes na atividade lipolítica em relação à obtida anteriormente com um meio conhecido para a produção de lipase.

De uma maneira geral, os suplementos que apresentaram efeito significativo positivo foram azeite de oliva e uréia quando se suplementou o farelo de soja.

Farelo de arroz como substrato

O Brasil é um grande produtor de arroz, sendo a região Sul o principal produtor de arroz do país. O farelo de arroz é um co-produto e é usado principalmente como alimentação animal, pois possui algumas enzimas que acidificam o óleo. Por este motivo, somente uma quantidade pequena do óleo é transformada em óleo comestível (<10%) (Magalhães *et al.*, 2006).

O farelo de arroz contém cerca de 87 % de matéria seca, 11 a 15 % de proteína bruta, 15 a 20% de lipídios e cinzas 6,5 %-10 % (Juliano e Becthel, 1994). O teor de gordura é caracterizado por uma composição de ácidos graxos de 34-37 % oléico, 36-42 % linoléico, 21-23 % palmítico, 1,7 % esteárico e 1,2 % linolênico (Campos *et al.*, 2007). Este substrato também contém proteínas com um bom equilíbrio de aminoácidos para os animais monogástricos. O baixo preço do farelo de arroz permite a redução do custo final da ração de suínos e aves, mas pode também ser utilizado como uma fonte de baixo custo para a produção de enzimas, como lipases.

A Tabela 18 demonstra a matriz do planejamento experimental Placket-Burman com valores reais e codificados dos seis suplementos utilizados no experimento e as respostas de

atividade de esterificação em 48 h de fermentação em estado sólido utilizando o farelo de arroz como substrato.

Tabela 19- Matriz do planejamento experimental Placket-Barman com valores reais e codificados das variáveis e as respostas de atividade de esterificação em 48 h com diferentes suplementos no farelo de arroz

Ensaio	AO (%p/p)	OS (%p/p)	OA (%p/p)	AMM (%p/p)	MC (%p/p)	U (%p/p)	AE (U/g)
1	(1) 1	(0) -1	(1) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	18,29
2	(1) 1	(1) 1	(0) -1	(4) 1	(0) -1	(0) -1	94,33
3	(0) -1	(1) 1	(1) 1	(0) -1	(4) 1	(0) -1	51,10
4	(1) 1	(0) -1	(1) 1	(4) 1	(0) -1	(2) 1	161,88
5	(1) 1	(1) 1	(0) -1	(4) 1	(4) 1	(0) -1	141,36
6	(1) 1	(1) 1	(1) 1	(0) -1	(4) 1	(2) 1	53,37
7	(0) -1	(1) 1	(1) 1	(4) 1	(0) -1	(2) 1	129,70
8	(0) -1	(0) -1	(1) 1	(4) 1	(4) 1	(0) -1	0
9	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(4) 1	(4) 1	(2) 1	0
10	(1) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(4) 1	(2) 1	11,69
11	(0) -1	(1) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(2) 1	58,70
12	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	47,64
13	(0,5) 0	(0,5) 0	(0,5) 0	(2) 0	(2) 0	(1) 0	106,57
14	(0,5) 0	(0,5) 0	(0,5) 0	(2) 0	(2) 0	(1) 0	101,60
15	(0,5) 0	(0,5) 0	(0,5) 0	(2) 0	(2) 0	(1) 0	132,41

Nota-se através da Tabela 18 que a maior AE da lipase foi encontrada no ensaio 4 (161,88 U/g de substrato seco), onde o farelo de arroz foi suplementado com 1 % (p/) AO, 1 % (p/) OA, 4 % (p/p) AMM e 2 % (p/p) de U, seguida do ensaio 5 (141,36 U/g de substrato seco) onde foram usados 1 % (p/p) AO, 1 % (p/p) OS, 4 % (p/p) AMM e 4 % (p/p) MC, estes valores foram superiores aos encontrados quando se estudou a atividade de esterificação em 48 h do farelo puro, mostrando que a suplementação foi necessária para se atingir a maximização da atividade.

Fontes de carbono e de nitrogênio para a produção da lipase de *Bacillus cereus* foram amido e sulfato de amônio (nível de nitrogênio 21,2 mg/100 mL), peptona (nível de nitrogênio 297 mg/100 mL), e uréia (nível de nitrogênio 46,62 mg/100 mL) em associação, respectivamente (Dutta e Ray, 2009). Quando *Penicillium citrinum* foi cultivado em meio simples (1,0 % do azeite e 0,5 % de extrato de levedura), utilizando óleo de oliva como fonte de carbono no inóculo, a enzima extraída mostrou atividade máxima. Além disso, a diminuição da concentração de extrato de levedura também reduz a atividade (Pimentel *et al.*, 1994).

Ferraz *et al.* (2010), estudando a produção de lipase por *Penicillium crustosum* em FES e utilizando como substrato o farelo de arroz, encontraram atividade de esterificação de 112,28 U/g de substrato seco (gss) e Kempka *et al.* (2008), investigando a produção de lipase por *Penicillium verrucosum*, encontraram cerca de 40 U/g de substrato seco.

Os suplementos utilizados no farelo de arroz que apresentaram resultados positivos com 90 % de significância foram azeite de oliva, óleo de soja e água de maceração de milho. O óleo de arroz não apresentou efeito significativo. Este fato provavelmente se dá devido a sua composição, pois pode ter levado a um excesso de nutrientes ao micro-organismo, causando um efeito inibitório. O melaço apresentou efeito significativo negativo. Os resultados referentes à análise estatística dos dados apresentados na Tabela 18 estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 20- Efeito das variáveis de processo, estudadas no planejamento experimental Plackett- Burman (PB) na produção de lipase após 48h de fermentação no farelo de arroz

	Efeito	Desvio	t(2)	p
Média	73,91	4,27	17,30	0,003
(1) AO	32,29*	9,55	3,38	0,077
(2) OS	48,17*	9,55	5,04	0,037
(3) OA	10,10	9,55	1,05	0,400
(4) AMM	47,74*	9,55	4,99	0,037
(5) MC	-42,17*	9,55	-4,41	0,047
(6) U	10,43	9,55	1,09	0,388

*Efeitos significativos $p < 0,1$.

Martins *et al.* (2008) utilizaram como substrato o farelo de arroz e a casca de arroz em FES junto com 1 % de óleo de soja como suplemento e encontraram uma atividade máxima de produção de lipase para o fungo *Phialemonium* de 129,5 U/g de substrato seco e para o fungo *Aspergillus fumigatus* de 119,40 U/g de substrato seco. Quando Alkan *et al.* (2006) pesquisaram a produção de lipase por *Bacillus coagulans* em FES utilizando resíduos sólidos de melão, encontraram atividade de 78,069 U/g em 24 h de fermentação suplementada com 1 % de azeite de oliva.

A produção de lipase é influenciada pelo conteúdo de carbono no meio quando este é de origem lipídica (Mahadik *et al.*, 2002). Segundo alguns trabalhos publicados, este comportamento está diretamente relacionado ao mecanismo de regulação do micro-organismo em estudo. Assim, alguns casos relatam que a suplementação do meio com lipídios não é eficiente (Kamini *et al.*, 1998).

Para o farelo de arroz observou-se que o azeite de oliva, óleo de soja e água de maceração de milho apresentaram efeito significativo positivo quando utilizados como suplementos na produção de lipase.

4.2.4 Maximização da produção de lipase com o uso de suplementos

Com objetivo de se atingir a maximização da produção de lipase através da suplementação dos farelos de soja e de arroz, dois planejamentos experimentais foram realizados com as variáveis que apresentaram efeito estatisticamente significativo ($p < 0,1$). Para o farelo de soja se realizou um DCCR 2² (azeite de oliva e uréia) e para o farelo de arroz se realizou um DCCR 2³ (azeite de oliva, óleo de soja e água de maceração de milho). Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados nas Tabelas 20 a 25.

Observa-se na Tabela 20 que a atividade de esterificação mais alta foi obtida com 2,6 % (p/p) de AO e 2,3 % (p/p) de uréia (186,26 U/g), seguida da triplicata do ponto central com 1,5 % (p/p) de AO e 5,5 % (p/p) de uréia (152,76; 157,46 e 155,11 U/g), onde se atingiu a otimização do processo. Através da Tabela 21, a qual apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de t e p, foi possível obter modelos empíricos para a atividade lipásica em função do azeite de oliva e da ureia em 48h de FES, utilizando o farelo de soja como substrato.

Tabela 21- Matriz do DCCR 2² (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de esterificação com *P. crustosum* e farelo de soja em 48 h

Ensaio	AO (%p/p)	U (%p/p)	AE (U/g)
1	(0,4) -1	(2,3) -1	90,42
2	(2,6) 1	(2,3) -1	186,26
3	(0,4) -1	(8,7) 1	124,75
4	(2,6) 1	(8,7) 1	43,35
5	(1,5) 0	(5,5) 0	152,76
6	(1,5) 0	(5,5) 0	157,46
7	(1,5) 0	(5,5) 0	155,11
8	(0) -1,41	(5,5) 0	141,82
9	(3) 1,41	(5,5) 0	156,71
10	(1,5) 0	(1) -1,41	30,02
11	(1,5) 0	(10) 1,41	93,99

Tabela 22- Coeficientes de regressão para a produção de lipase após 48h de FES utilizando farelo de soja como substrato e diferentes suplementos

	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	t(5)	p
Média	155,09	18,32	8,46	0,00
(1) AO (L)	4,44	11,23	0,39	0,70
AO (Q)	-1,45	13,40	-0,10	0,91
(2)U (L)	-2,30	11,23	-0,20	0,84
U (Q)	-45,34	13,40	-3,38	0,01
1L by 2L	-44,30	15,86	-2,79	0,038

O modelo codificado otimizado para 48 horas de fermentação pode ser visualizado na Equação 7 para a atividade lipásica e foi validado pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 22.

$$AEFS = 155,09 + 4,44.AO - 1,45.AO^2 - 2,30.U - 45,34.U^2 - 44,30.AO.U$$

Equação 7

Onde:

AE= Atividade esterificação em 48h de fermentação com farelo de soja (FS);

AO= Azeite de oliva;

U= Uréia.

Observa-se que o coeficiente de correlação obtido (0,89) e o valor de F calculado (4,05) maior que o F tabelado (3,45) permitiram a validação do modelo matemático com 90 % de confiança. Com o modelo validado foi possível construir a superfície de resposta (a) que é apresentada juntamente com a curva de contorno (b) na Figura 3. Estas figuras mostram que a condição maximizada para a produção de lipase a partir de farelo de soja como substrato é obtida através da suplementação do meio com 1,5 % (p/p) de azeite de oliva e 5,5 % (p/p) de uréia.

Tabela 23- Análise de variância para atividade lipásica no tempo de 48h utilizando FS como substrato

Fontes de variação	SQ	GL	SQM	F Calculado
Regressão	20417,53	5	4083,50	4,05
Resíduos	5035,76	5	1007,15	
Total	25453,30	10		

Coeficiente de correlação: $R=0,89$; $F_{tab,90\%} = 3,45$

Onde:

SQ= Soma dos quadrados;

GL= graus de liberdade;

SQM= Soma dos quadrados médios

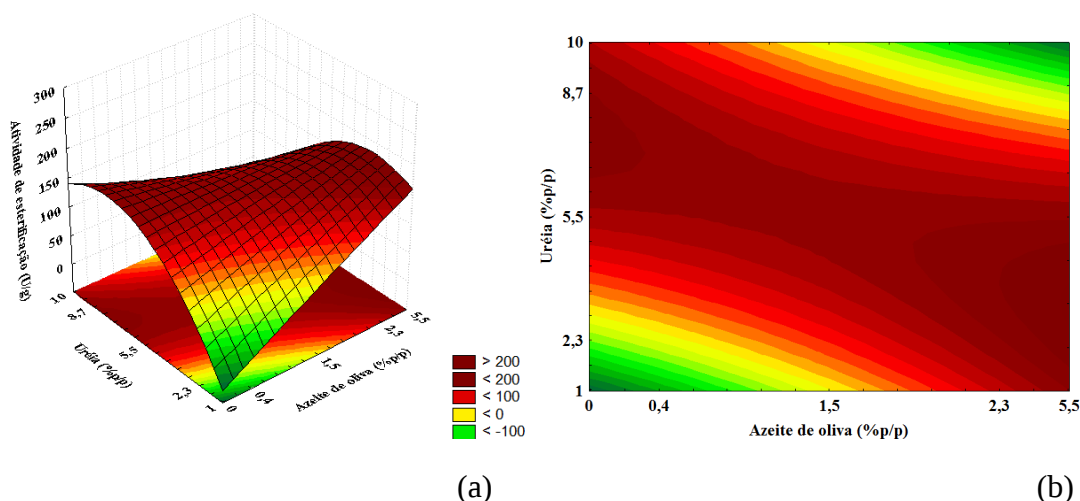


Figura 3- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de esterificação em 48 horas de fermentação utilizando farelo de soja como substrato e azeite de oliva e uréia como suplementos.

A Tabela 23 apresenta a matriz do DCCR 2³ (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de esterificação com *P. crustosum* e farelo de arroz em 48h.

A mais alta atividade foi obtida com 0,4 % (p/p) de AO, 2,6 % (p/p) de OS e 2,3 % (p/p) de AMM (140,03 U/g) e a mais baixa atividade foi de 12,57 U/g quando se adicionou 1,5 % (p/p) de AO, 3 % (p/p) OS e 5,5 % (p/p) de AMM, provavelmente levando a um excesso de lipídios ao substrato. Estes resultados são superiores aos encontrados por os autores citados abaixo.

O bagaço de cana suplementado com azeite de oliva resultou em eficiente produção de lipase por *Rhizopus rhizopodiformes* e *Rhizomucor pusillus*, obtendo-se atividades de 79,60 e 20, 24 U/g com o uso de precursores adequados (Cordova *et al.*, 1998).

A produção de lipase em FES com *Aspergillus niger* 11T53A14, utilizando farelo de trigo indicou a suplementação do meio com resíduo de refinaria de milho, como promissor indutor, resultando em atividade lipásica de 60 U/g (Damaso *et al.*, 2008).

A condição otimizada para a produção de lipase e esterase descritas por SILVA (2010) foi em meio contendo óleo de soja 2% m/m, umidade 70%, temperatura 30°C, tanto para o farelo de mamona como para a torta de babaçu.

Tabela 24- Matriz do DCCR 2³ (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de esterificação com *P. crustosum* e farelo de arroz em 48h

Ensaio	AO (% p/p)	OS (% p/p)	AMM (% p/p)	U/g
1	(0,4) -1	(0,4) -1	(2,3) -1	106,83
2	(2,6) 1	(0,4) -1	(2,3) -1	122,51
3	(0,4) -1	(2,6) 1	(2,3) -1	140,03
4	(2,6) 1	(2,6) 1	(2,3) -1	93,56
5	(0,4) -1	(0,4) -1	(8,7) 1	97,59
6	(2,6) 1	(0,4) -1	(8,7) 1	133,69
7	(0,4) -1	(2,6) 1	(8,7) 1	82,35
8	(2,6) 1	(2,6) 1	(8,7) 1	35,41
9	(1,5) 0	(1,5) 0	(5,5) 0	66,23
10	(1,5) 0	(1,5) 0	(5,5) 0	68,14
11	(1,5) 0	(1,5) 0	(5,5) 0	64,31
12	(0) -1,68	(1,5) 0	(5,5) 0	135,92
13	(3) 1,68	(1,5) 0	(5,5) 0	34,55
14	(1,5) 0	(0) -1,68	(5,5) 0	79,92
15	(1,5) 0	(3) 1,68	(5,5) 0	12,57
16	(1,5) 0	(1,5) 0	(1) -1,68	109,69
17	(1,5) 0	(1,5) 0	(10) 1,68	103,14

A Tabela 24 apresenta os coeficientes de regressão para a produção de lipase após 48 h de fermentação em estado sólido (FES) utilizando farelo de arroz como substrato suplementado com azeite de oliva, óleo de soja e água de maceração de milho.

De acordo com a tabela de caracterização de suplementos (Tabela 13) o azeite de oliva e o óleo de soja são ricos em lipídios, já a água de maceração de milho possui pouco lipídio (0,6 %) mas os três substratos são excelentes fontes de carbono contribuindo assim para o crescimento microbiano e levando ao incremento da produção de enzimas.

Tabela 25- Coeficientes de regressão para a produção de lipase após 48 h de FES utilizando farelo de arroz como substrato e diferentes suplementos

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(7)	p
Média	64,80	14,13	4,58	0,002
(1) AO (L)	-15,53	6,64	-2,33	0,05
AO (Q)	11,50	7,31	1,57	0,15
(2) OS (L)	-16,30	6,64	-2,45	0,04
OS (Q)	-2,309	7,31	-0,31	0,76
(3) AMM (L)	-9,15	6,64	-1,37	0,21
AMM (Q)	19,00	7,31	2,59	0,03
1L by 2L	-18,14	8,67	-2,09	0,07
1L by 3L	2,49	8,67	0,28	0,78
2L by 3L	-14,72	8,67	-1,69	0,13

Através da Tabela 24 foi possível obter o modelo empírico para a atividade lipásica em função do AO, OS e AMM em 48 h de FES, utilizando farelo de arroz como substrato. O modelo codificado otimizado para 48 horas pode ser visualizado na Equação 8 para a atividade lipásica e foi validado pela análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 25.

$$AEFA = 64,80 - 15,53.AO + 11,50.AO^2 - 16,30.OS - 2,30.OS^2 - 9,15.AMM + 19,00.AMM^2 - 18,14.AO.OS + 2,49.AO.AMM - 14,72.OS.AMM$$

Equação 8

Onde:

AEFA= Atividade de esterificação em 48h de fermentação com farelo de arroz (FA);

AO= Azeite de oliva;

OS= Óleo soja;

AMM=Água de maceração de milho.

Observa-se na Tabela 25 que o coeficiente de correlação obtido (0,90) e o valor de F calculado (3,33) maior que o F tabelado (2,72) permitiram a validação do modelo matemático com 90 % de confiança.

Tabela 26- Análise de variância para atividade lipásica no tempo de 48 h utilizando FA como substrato e diferentes suplementos

Fontes de variação	SQ	GL	SQM	F Calculado
Regressão	18080,72	9	2008,96	3,33
Resíduos	4212,23	7	601,74	
Total	22292,95	16		

Coeficiente de correlação: $R=0,90$ $F_{tab,90\%} = 2,72$

De acordo com a análise estatística observa-se que somente a AMM apresentou efeito significativo ($p<0,1$) positivo quando suplementado no farelo de arroz. O OS e o AO apresentaram efeito significativo negativo ($p<0,1$) indicando que esses óleos poderiam estar causando inibição por excesso de substrato para o micro-organismo, reduzindo assim a atividade de esterificação da enzima.

Com base nos resultados obtidos a partir de análise estatística foi realizado um novo teste somente utilizando a suplementação do farelo de arroz com 5,5 % (p/p) de AMM para se obter a otimização da produção de lipase em processo de FES em 48 h utilizando o fungo filamentosso *Penicillium crustosum*, conforme mostra a Tabela 26.

Tabela 27- Suplementação do farelo de arroz com AMM com triplicata do ponto central

Ensaio	AMM (%p/p)	AE (U/g)
1	5,5	98,65
2	5,5	90,42
3	5,5	94,54

Através de análises estatísticas e dos resultados demonstrados na Tabela 26 pode-se verificar a otimização da produção de lipase utilizando farelo de arroz como substrato suplementado com AMM (5,5 % p/p) e o fungo *Penicillium crustosum*. Cabe salientar que a AMM é um excelente suplemento de baixo custo, pois é um subproduto obtido a partir da extração do milho, reduzindo assim os custos finais para a produção de enzimas, além de contribuir para a redução de poluentes ambientais. Resultados opostos ao do experimento foram encontrados por Rigo *et al.* (2010). Estes autores verificaram que a adição de 1 % (m/v) dos suplementos ao farelo de soja não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a produtividade obtida em 48 h de fermentação com farelo de soja sem suplemento e a obtida em meio contendo Os e AMM.

4.2.5 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

Após a maximização da otimização da produção das lipases em termos de atividade de esterificação, novas fermentações foram conduzidas, levando em consideração as condições ótimas de umidade (60 %) e temperatura (30 °C) e a suplementação para a produção dos extratos enzimáticos a serem caracterizados de forma parcial. A caracterização foi realizada aos extratos provenientes das enzimas produzidas por ambos os substratos (FS e FA) e pelo fungo filamentoso *P. crustosum*.

As enzimas produzidas foram caracterizadas parcialmente em relação à estabilidade em temperaturas altas e baixas, especificidade ao substrato de esterificação (diferentes ácidos graxos e álcoois) e faixas de temperatura de atuação e memória de pH.

4.2.5.1 Avaliação da especificidade aos substratos de esterificação

Ésteres são importantes compostos orgânicos com um número crescente de aplicações comerciais. Estes compostos são muito utilizados para a preparação de compostos aromáticos (*flavors*), cosméticos, detergentes, sabor, produtos farmacêuticos e biodiesel. Muitos dos ésteres disponíveis são produzidos por sínteses químicas ou enzimáticas. A produção biotecnológica de ésteres utilizando lipases tem recebido grande atenção por causa das condições de reações brandas (temperatura, pH e pressão) envolvidas, o elevado grau de

pureza alcançado, bem como a aceitação destes produtos na indústria de alimentos (Martínez-Ruiz *et al.*, 2008).

Desta forma a especificidade das lipases produzidas em farelo de soja e arroz foram avaliadas nos ácidos graxos, butírico e láurico, com cadeia carbônica saturada (4 e 12 carbonos, respectivamente) e oleico (18 carbonos e cadeia insaturada). As atividades lipásicas das enzimas empregando cada ácido graxo foram avaliadas utilizando quatro álcoois com diferentes números de carbono nas cadeias; metanol, etanol, propan-1-ol e butan-1-ol, que apresentam, respectivamente, 1, 2, 3 e 4 átomos de carbono na cadeia carbônica.

As atividades lipásicas dos extratos enzimáticos liofilizados referentes ao emprego dos ácidos butírico, oleico e láurico como substratos para as reações de esterificação utilizando diferentes álcoois estão apresentadas nas Figuras 4, 5 e 6, respectivamente.

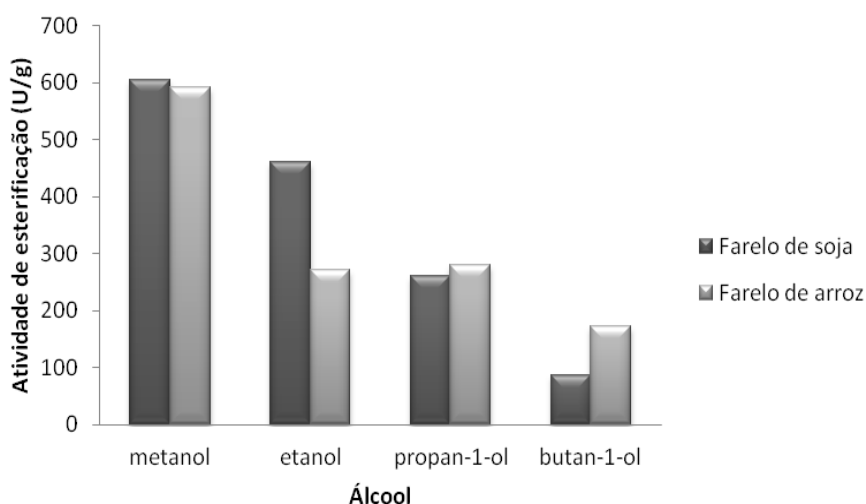


Figura 4- Especificidade do extrato enzimático (farelo de soja e de arroz) da reação do ácido butírico em diferentes alcoóis.

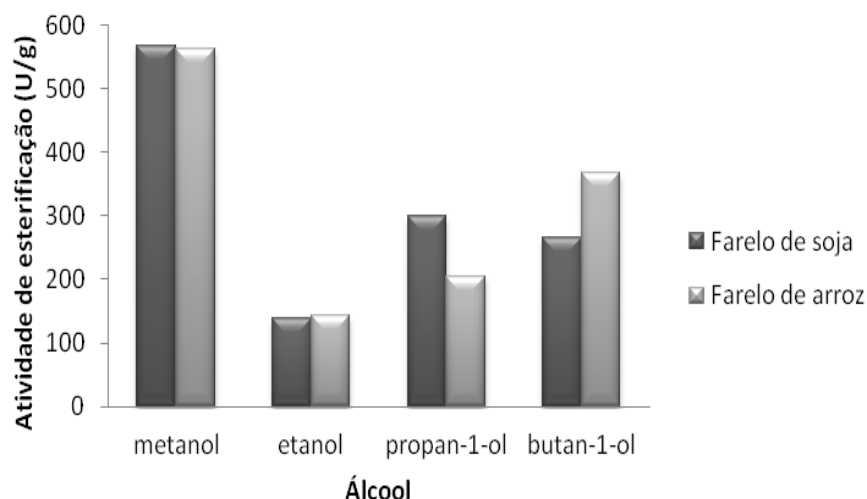


Figura 5- Especificidade do extrato enzimático (farelo de soja e de arroz) da reação do ácido oleico em diferentes alcoóis.

Através das Figuras 4 e 5 é possível observar que o emprego do ácido butírico e do ácido oleico como doadores de acila reagindo com metanol como álcool, resultou nas maiores atividades lipásicas, com um pico de atividade de 604,95 U/g e de 567,19 U/g para a enzima produzida utilizando FS e de 592,65 U/g e 562,13 U/g para a enzima produzida quando se utilizou FA como substrato, respectivamente. A segunda maior atividade lipásica no farelo de soja como substratos foi quando o ácido butírico reagiu com o álcool etanol (459,38 U/g), já para o farelo de arroz a segunda maior atividade lipásica foi de 367,57 U/g utilizando o ácido oleico juntamente com o álcool butanol. Lipases estáveis especialmente frente ao metanol e etanol, são consideradas de extrema importância, devido a possibilidade de serem usadas como catalisadores em reações para produção de biodiesel (Shimada *et al.*, 2002; Fukuda *et al.*, 2001). Assim, pesquisas que envolvem a identificação e produção de lipases tolerantes a álcoois são de grande relevância, já que atualmente há necessidade da redução do custo dos biocatalisadores aplicados na produção de biocombustíveis por via enzimática.

Comportamento oposto foi observado por Rigo *et. al* (2009) na produção de lipase por FES utilizando farelo de soja como substrato e uma cepa de *Penicillium* P74, ao adicionar metanol ao invés de propan-1-ol na reação com ácido oléico diminuiu a atividade de esterificação de 104,97 U/g para 1,57 U/g. Pode-se dizer que as enzimas usadas nesta reação podem efetuar a síntese de etil oleato.

Ferraz (2010b) estudando a especificidade da levedura *Sporobolomyces ruberrimus* frente a diferentes ácidos e álcoois encontraram atividade lipásicas para o ácido butírico de

446,50 U/g para a enzima produzida utilizando farelo de soja (FS) como substrato, reagindo com metanol como álcool. Essa mesma enzima apresentou a segunda maior atividade lipásica de 362,16 U/g quando da utilização do ácido butírico reagiu com etanol como álcool.

Uma menor tendência em termos de atividade de esterificação pode ser observado através da Figura 6 para a reação de ácido láurico, quando comparado aos ácidos oleico e butírico. O pico mais elevado de atividade enzimática foi quando o ácido láurico reagiu com o álcool butan-1-ol. Foram encontradas atividades de esterificação de 306,31 U/g e 222,91 U/g para o farelo de soja e para o farelo de arroz, respectivamente. Apesar da reação de especificidade da enzima frente ao ácido láurico ter demonstrado menores atividades quando comparado aos outros ácidos estudados, nota-se que essas atividades enzimáticas foram também promissoras, pois esse fato indica que há uma especificidade em ambos substratos testados, tanto para ácidos de cadeia curta e longa saturada, quanto para cadeia longa insaturada.

Trabalhos encontrados na literatura avaliando a especificidade de lipases em relação a ácidos graxos com diferentes cadeias carbônicas em geral relatam maior especificidade dessas enzimas em relação a ácidos graxos de cadeia média a longa (C8 a C16), podendo-se citar os trabalhos desenvolvidos por Sun e Xu (2009) e Wang *et al.* (2008).

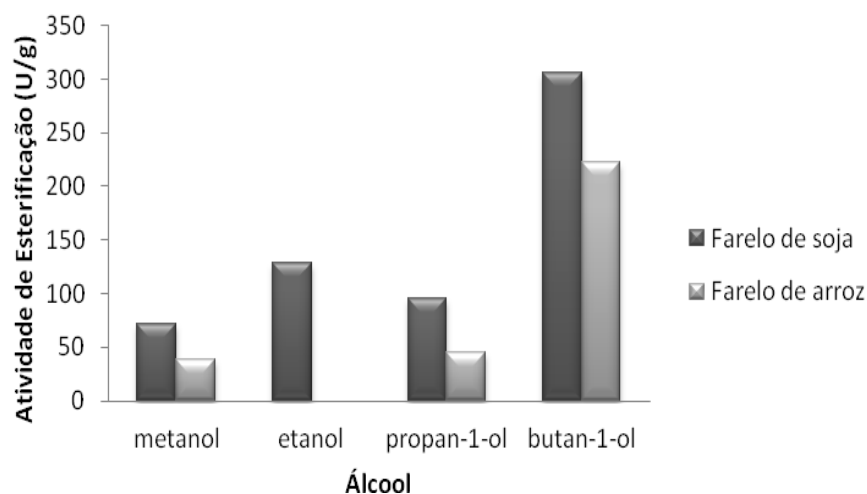


Figura 6- Especificidade do extrato enzimático (farelo de soja e de arroz) da reação do ácido laurico em diferentes alcoóis.

Segundo Silva *et al* (2011^b), o extrato enzimático obtido por fermentação em estado sólido de *P. brevicompactum* e torta de babaçu como matéria-prima apresentou preferência para os triglicerídeos de cadeia média e ácidos graxos de cadeia longa

Levando em conta algumas obras da literatura, pode-se ver que as lipases mostram preferência diferentes em função do substrato e do micro-organismo utilizado para produção de enzimas. Lipase de *Bacillus* sp. A30-1, (Wang *et al.*, 1995) e produzido por *Rhizopus oryzae* (Razak *et al.* 1997) apresentou uma maior especificidade de triglicérides de cadeia média, já lipases de *Aspergillus carneus* apresentou boas atividades em um tipo de variedade de triglicerídeos (C4 para C18) (Saxena *et al.*, 2003).

A maior especificidade em relação ao ácido graxo de cadeia curta obtido neste trabalho concorda com os resultados apontados por Peter e Preda (2002), que avaliaram a especificidade de uma lipase de pâncreas de porco em relação a diversos ácidos graxos (de 3 a 18 carbonos). Segundo esses autores, a lipase avaliada apresentou uma elevada especificidade em relação aos ácidos valérico (C5) e butírico (C4), e uma atividade de esterificação significativamente menor para ácidos com números de carbono menores (propiónico) e maiores (C6-C16). A especificidade voltou a aumentar para ácidos de cadeia longa (C18), porém permaneceu significativamente mais baixa que para os substratos anteriores.

Contudo, apesar de álcoois de cadeia maior ser capazes de liberar maiores energias de ligação, uma parte dessa energia é requerida para modificar a conformação do substrato para que este caiba no sítio ativo da enzima. Então, apenas uma pequena parte da energia liberada estaria disponível para a mudança na conformação da enzima (Abbas e Comeau, 2003). Estas alterações na conformação das lipases para torná-las ativas dependem de ambos os substratos que estão sendo empregados na reação de esterificação (ácido graxo e álcool). Sendo a afinidade das enzimas pelos substratos interdependentes em relação à cadeia carbônica e à estrutura de ambos, a especificidade não pode ser avaliada separadamente.

Tendo em vista os resultados apresentados, os extratos enzimáticos obtidos apresentam potencial para catalisar reações de esterificação entre álcoois e ácidos graxos de cadeia curta, produzindo ésteres usualmente empregados na indústria como *flavors* e um grande potencial para catalisar reações de esterificação entre ácidos de cadeia longa insaturados e álcool de cadeia curta, ou seja, reações de transesterificação como para a produção de biodiesel.

4.2.5.2 Avaliação da estabilidade em altas temperaturas

A estabilidade térmica dos extratos enzimáticos brutos liofilizados, produzidos pelo fungo filamentoso *Penicillium crustosum* utilizando farelo de soja e de arroz como substrato nas temperaturas de 35, 45 e 60 °C foi monitorada (Figuras 7,8 e 9), quanto à atividade de esterificação, ao longo de 384 horas, em intervalos de tempos regulares a cada 24 horas, buscando prolongar o tempo de acompanhamento do comportamento da enzima frente às altas temperaturas.

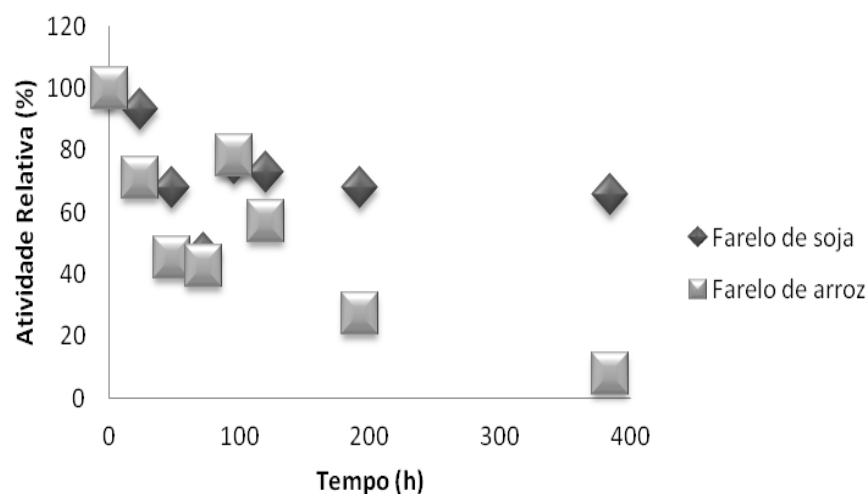


Figura 7- Estabilidade termica do extrato enzimático bruto a 35 °C.

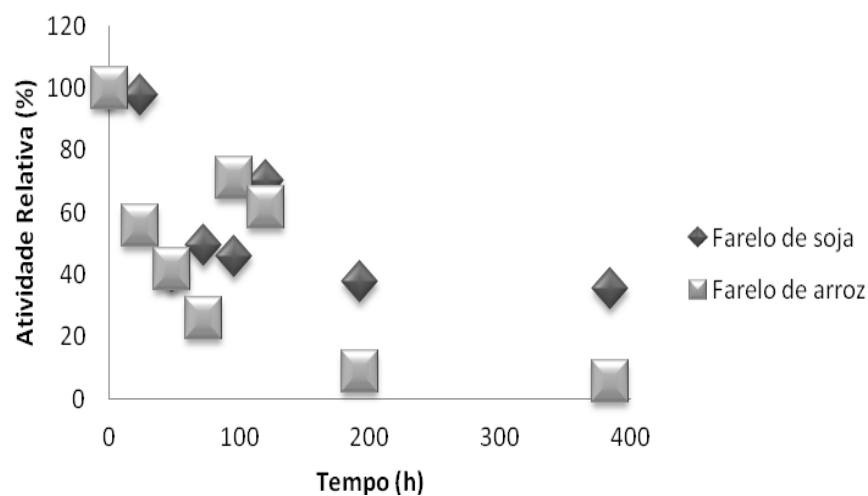


Figura 8- Estabilidade termica do extrato enzimático bruto a 45 °C.

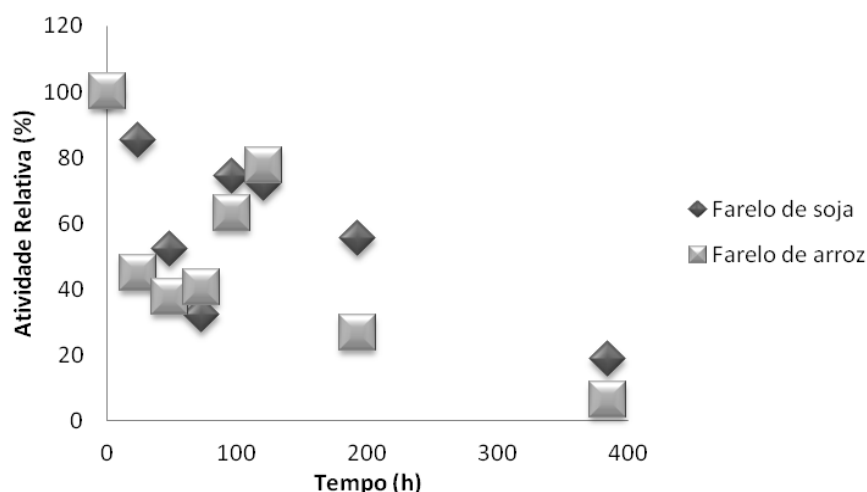


Figura 9- Estabilidade térmica do extrato enzimático bruto a 60 °C.

Importantes resultados foram obtidos, revelando que a lipase produzida em farelo de soja em diferentes temperaturas apresentaram comportamento similar, ou seja, decréscimo inicial da atividade relativa da enzima nas temperaturas avaliadas. Após 96 horas a enzima apresentou um aumento expressivo na sua atividade relativa, demonstrando um leve até decréscimo até 384 h com atividade relativa aproximada a 65 % a 35 °C. Já a 45 °C ocorreu decréscimo da atividade relativa após 120 horas, resultando em atividade relativa de 35 % ao final das 384 horas e 18 % a 60 °C. Assim, a enzima obtida na fermentação com farelo de soja, ao longo da avaliação da sua estabilidade apresentou maior estabilidade em 35 °C, contudo em 24 horas, ambas as temperaturas resultaram em atividade relativa em torno de 90 % da atividade inicial.

No caso da lipase obtida da fermentação do farelo de arroz, pode-se observar através das Figuras 7, 8 e 9, representativas a avaliação da estabilidade frente às temperaturas de 35, 45 e 60 °C respectivamente, uma proximidade do comportamento da lipase obtida da fermentação com farelo de soja até 120 horas. Após este período, ocorreu queda gradativa, chegando a resultando de atividade relativa menor que 20 % da inicial ao final das 384 horas de avaliação, sendo menos estável que a enzima produzida em farelo de arroz no período máximo avaliado.

Ferraz *et al* (2011) estudando a estabilidade de três substratos (farelo de soja, de arroz e bagaço de cana) encontram pouca ativação enzimática em 35 °C. O extrato de bagaço de cana apresentou um pico de atividade e alta estabilidade, mantendo a sua atividade até 144 horas

de incubação, os outros dois substratos ficaram completamente desativado após 120 horas de incubação.

De acordo com Casa *et al.* (2006) a estabilidade térmica de lipases bruta no solvente orgânico, a 30 °C obteve um tempo de meia-vida de cerca de 6 dias. Wolski (2008) avaliou a estabilidade térmica do extrato enzimático obtido utilizando *Penicillium* sp. livre e imobilizado em diferentes tempos (de 30 a 480 minutos) e temperaturas de 25, 35, 45, 55 e 65 °C. Percebeu-se que os dois extratos apresentaram comportamento semelhante. Ambos apresentaram uma diminuição da atividade, no tempo zero de incubação e maior estabilidade em temperaturas de 25 e 35 °C.

Liu *et al* (2008) estudando a atividade da lipase *Aureobasidium pullulans* HN2.3 medida em função da temperatura mostraram que a atividade residual da lipase foi mantida em 100 e atividade de 71 % em relação ao controle, após tratamento a 20 e 30 °C durante uma hora, respectivamente, indicando que a enzima foi estável até 20 °C. Os resultados também revelam que a enzima foi inativada rapidamente em temperatura superior a 20 °C e foi totalmente inativada a 50 °C dentro de uma hora.

Padilha *et al.* (2011) estudando a estabilidade da lipase extracelular produzida a partir da *Pseudomonas cepacia* constatou que à 50 e 60 °C foi afetada significativamente durante a primeira hora de exposição, seguindo um modelo de inativação de primeira ordem. A inativação da lipase durante 60, 90 e 120 minutos a 50 e 60 °C foram respectivamente, 34, 33 e 45 %.

De acordo com Sharma *et al.* (2001), a estabilidade térmica de uma lipase está relacionada com a sua estrutura, sendo influenciada por diversos fatores ambientais. O fator mais importante é o meio em que a enzima se encontra, já que a presença de água diminui fortemente a termoestabilidade.

Tanto para o farelo de soja como para o de arroz obteve-se uma melhor estabilidade quando esses substratos foram armazenados em 35 °C, mostrando resultados superiores quando comparado com os autores citados acima.

4.2.5.3 Avaliação da estabilidade em baixas temperaturas e temperatura ambiente

As estabilidades dos extratos enzimáticos liofilizados das enzimas produzidas pelo fungo *Penicillium crustosum* utilizando como substratos os farelos de soja e de arroz, foram

avaliadas durante o armazenamento em refrigerador (4 °C), freezer (-10 °C) e temperatura ambiente ao longo de 1680 horas (70 dias) conforme demonstram as figuras 10, 11 e 12 dêem termos de atividade lipásica relativa (%), respectivamente.

Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade nas diferentes temperaturas possibilitaram caracterizar o comportamento das lipases produzidas em farelo de soja e de arroz, no decorrer de 70 dias. As maiores estabilidades das lipases produzidas em farelo de soja e de arroz foram obtidas nas temperaturas de refrigeração e freezer. Nas Figuras 10 e 11 pode ser visualizado que as maiores atividades relativas para as lipases produzidas em FS foram após 30 dias de estocagem sob refrigeração (195 %) e em 20 dias no congelador (173 %).

A lipase obtida por fermentação em estado sólido de *P. brevicompactum* e torta de babaçu como matéria-prima, permitiu a observação de que o extrato mantinha a sua atividade, tanto a 4 e -10 ° C até 30 dias, pelo menos (Silva *et al.*, 2011^a).

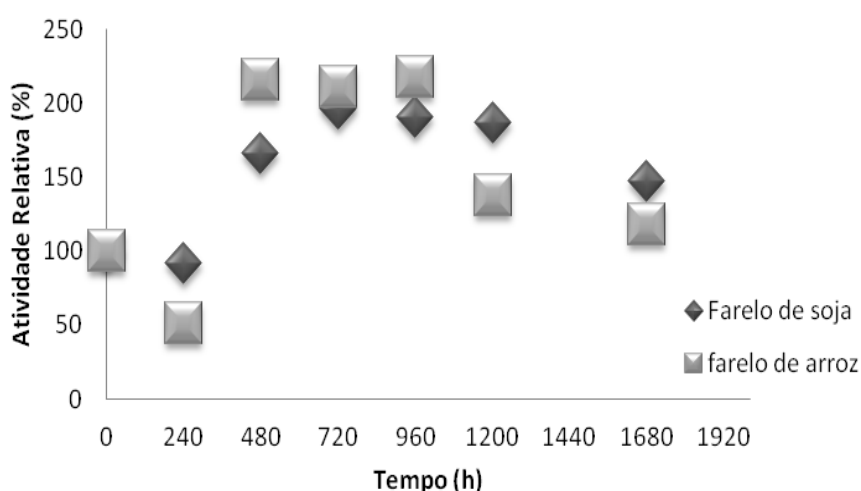


Figura 10- Atividades lipásicas relativas (%) das enzimas ao longo do período de armazenamento em refrigeração (4 °C).

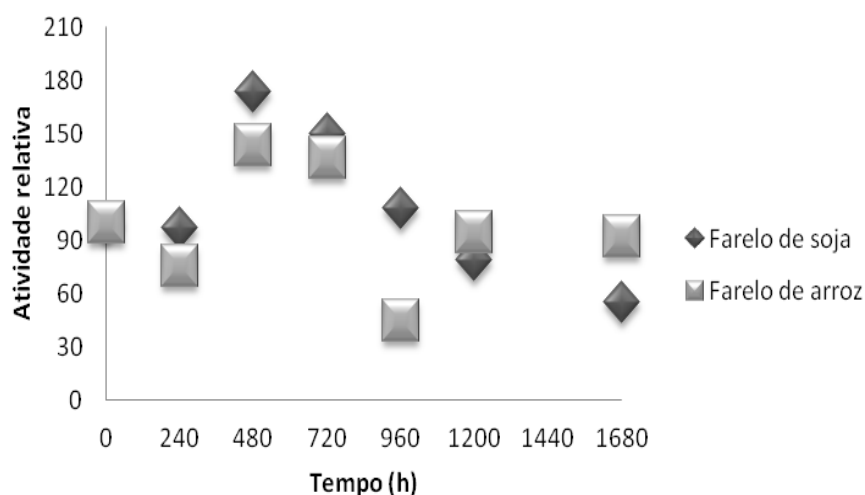


Figura 11- Atividades lipásicas relativas (%) das enzimas ao longo do período de armazenamento em freezer (-10 °C).

Quando o extrato foi mantido a temperatura ambiente de 20 a 50 dias de estocagem a atividade relativa manteve-se estável em 150 % como pode ser observado na Figura 12.

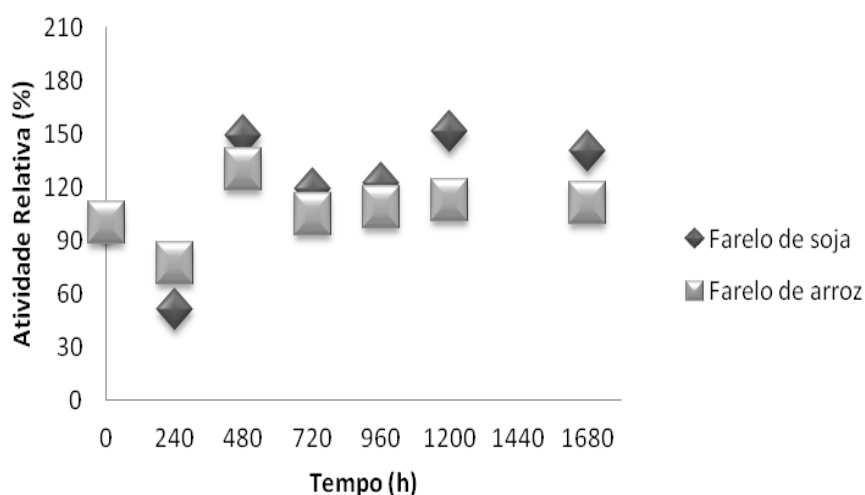


Figura 12- Atividades lipásicas relativas (%) das enzimas ao longo do período de armazenamento em temperatura ambiente.

No caso das lipases produzidas em farelo de arroz, comportamento similar foi observado já que as maiores estabilidades também foram obtidas nas temperaturas de refrigeração e congelamento. A atividade relativa obtida durante o período estocagem sob

refrigeração de 20 a 40 dias foi em torno de 200 % da inicial e quando avaliada a temperatura a -10 °C foi de 134 % em 20 dias, próxima a obtida em temperatura ambiente que foi de 130% no mesmo período de estocagem.

Importante ainda ressaltar que ambas as lipases produzidas em farelo de soja como arroz apresentaram valores relevantes de atividade ao final do período avaliado (70 dias), as menores atividades relativas foram obtidas quando as enzimas foram mantidas em temperatura de congelamento, 54 e 91 % para FS e FA, respectivamente.

De acordo com Ferraz *et al.*, (2010^b) a enzima obtida com bagaço de cana apresentou maior estabilidade, mantendo atividade relativa (%) acima de 100 % da inicial quando conservada em temperatura ambiente e 50 % em freezer (-10 °C), após os 60 dias.

Segundo Sharma *et al.* (2001), a estabilidade térmica de uma lipase está relacionada com a sua estrutura, sendo influenciada por diversos fatores ambientais. O fator mais importante é o meio em que a enzima se encontra, já que a presença de água diminui fortemente a termoestabilidade. Em alguns casos sua desnaturação térmica ocorre quando o desdobramento dos polipeptídeos no sítio ativo fica em estado intermediário (Zhu *et al.*, 2001).

Como conclusão parcial observou-se que o farelo de soja e de arroz mantiveram estabilidade térmica em 1680 h tanto para temperatura de 4 °C (146 %, 117 %) como em temperatura ambiente (139%, 111 %),respectivamente.

4.2.5.4 Avaliação do efeito da temperatura e memória de pH na atividade lipásica

De acordo com Sun & Xu (2009), as enzimas liofilizadas apresentam uma memória de pH, ou seja, a atividade de esterificação em solventes orgânicos é extremamente dependente da solução aquosa antes da liofilização. A memória do pH, provavelmente, ocorre porque a fixação dos grupos iônicos catalíticos protéico após a secagem da enzima mantém o mesmo estado em meios não aquosos. Para avaliar o comportamento dos extratos enzimáticos em diferentes temperaturas e memórias de pH, o DCCR 2² foi realizado para cada substrato testado conforme mostrado na Tabela 27.

Tabela 28- Matriz do delineamento experimental (valores reais e codificados) e a resposta em termos de atividade de esterificação avaliando temperatura e memória de pH

Ensaio	pH	T (°C)	AE (U/g)	
			FS	FA
1	-1 (4,0)	-1 (20)	310,26	302,91
2	+1 (9,0)	-1 (20)	270,48	429,23
3	-1 (4,0)	+1 (60)	257,61	228,46
4	+1 (9,0)	+1 (60)	276,92	270,77
5	0 (6,5)	-1,41(11,8)	406,88	493,21
6	0 (6,5)	1,41 (68,2)	243,00	134,62
7	-1,41(3,0)	0 (40)	236,80	141,71
8	1,41 (10,0)	0 (40)	341,96	393,14
9	0 (6,5)	0 (40)	251,00	304,95
10	0 (6,5)	0 (40)	296,00	271,40
11	0 (6,5)	0 (40)	273,50	288,18

Pode-se observar que os valores de maior atividade foram obtidos no ensaio 5 para a uma memória de pH de 6,5 e 11,8 °C, para os dois substratos testados no experimento. O extrato produzido por farelo de arroz apresentou atividade de esterificação de 493,21 U/g de extrato bruto liofilizado e para o o farelo de soja foi de 406,88 U/g de extrato bruto liofilizado, mostrando que as enzimas apresentaram atividades mais elevadas em pH próximo da neutralidade e da menor temperatura.

Smaniotto (2010), estudando o efeito da temperatura e memórias de pH em diferentes lipases sintéticas, observou que para enzimas brutas obtidas de meio convencional apresentavam os maiores valores de atividade lipásica sintética na região do ponto central (média de 145,07 U/ g), em um valor de memória de pH próximo à neutralidade (6,5) e temperatura de 40 °C.

O mesmo autor observou ainda, que para as enzimas provenientes da fermentação do meio industrial, os maiores valores de atividades foram obtidos em uma ampla faixa de pH (de 4,0 a 9,0) e em temperaturas mais altas (de 40 a 68,2 °C). Nas condições de temperatura mais baixas e nos extremos de pH não foi observada atividade enzimática para nenhuma das enzimas provenientes da fermentação do meio industrial.

Os coeficientes de regressão para atividade de esterificação (U/g) em diferentes Temperatura (°C) e memória de pH para o FS estão demonstrados na Tabela 28.

Tabela 29- Coeficientes de regressão para atividade de esterificação (U/g) do farelo de soja em diferentes T^a e memória de pH

	Coeficientes de regressão	Erro Puro	t(5)	p
Media	273,60	24,98	10,94	0,00
(1) pH (L)	32,04	30,65	1,04	0,34
pH (Q)	3,17	36,57	0,08	0,93
(2) T (L)	-64,88	30,65	-2,11	0,08
T (Q)	32,34	36,57	0,88	0,41
1L * 2L	29,54	43,28	0,68	0,52

Tratando os dados estatisticamente observa-se que na faixa de memória de pH avaliada no experimento, as atividades de esterificação não mudaram significativamente. Mas em relação a temperatura (°C) nota-se que a mesma afeta de maneira negativa a atividade da enzima bruta, na faixa avaliada com 90% de confiança. Estes dados indicaram que há uma preferência enzimática quando se utilizou o farelo de soja como matéria-prima por temperaturas mais baixas.

A Tabela 29 apresenta os coeficientes de regressão para a atividade de esterificação do farelo de arroz em diferentes temperaturas e memória de pH.

Tabela 30- Coeficientes de regressão para atividade de esterificação (U/g) do farelo de arroz em diferentes Temperatura (°C) e memórias de pH

	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	t(5)	p
Média	269,62	31,84	8,46	0,002
(1) pH (L)	65,58	19,52	3,35	0,02
pH (Q)	3,18	23,30	0,13	0,89
(2) T (L)	-92,59	19,52	-4,74	0,005
T (Q)	26,56	23,30	1,13	0,30
1L * 2L	-21,00	27,57	-0,76	0,48

Os resultados apresentados na Tabela 29 foram tratados estatisticamente e a Equação 9 apresenta o modelo empírico obtido para os extratos enzimáticos de farelo de arroz. O modelo foi validado ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$) pela análise de variância, 95 % do nível de confiança.

$$AEFA = 269,62 + 65,58 \text{ pH} + 3,18 \text{ pH}^2 - 92,59 T + 26,56 T^2 - 21,00 \text{ pH} * T$$

Equação 9

AEFA= Atividade de esterificação para farelo de arroz,

T= Temperatura,

pH= Valores de pH.

Observa-se na Tabela da análise de variância (Tabela 30) que o coeficiente de correlação obtido (0,93) e o valor de F calculado (7,13) maior que F tabelado (5,05) permitiram a validação do modelo matemático com 95 % de confiança.

Tabela 31- Análise de variância para a avaliação da significância estatística dos modelos propostos para a atividade de esterificação (U/g) das enzimas do farelo de arroz

Fontes de variação	SQ	GL	SQM	F Calculado
Regressão	108537,2	5	108537,2	7,13
Resíduos	15210,3	5	15210,3	
Total	123747,5	10		

Coeficiente de correlação: R=0,93 Ftab,95 % = 5,05

A validação do modelo matemático permitiu a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 13, onde é possível observar que as enzimas provenientes da fermentação utilizando FA como substrato apresenta as maiores atividades em temperaturas baixas (cerca de 11,8 a 20 °C) e memórias de pH alcalinos. Através desta

análise fica evidente que temperaturas muito altas e pH ácidos tendem a reduzir a atividade ou desativar as enzimas produzidas nas condições descritas neste trabalho.

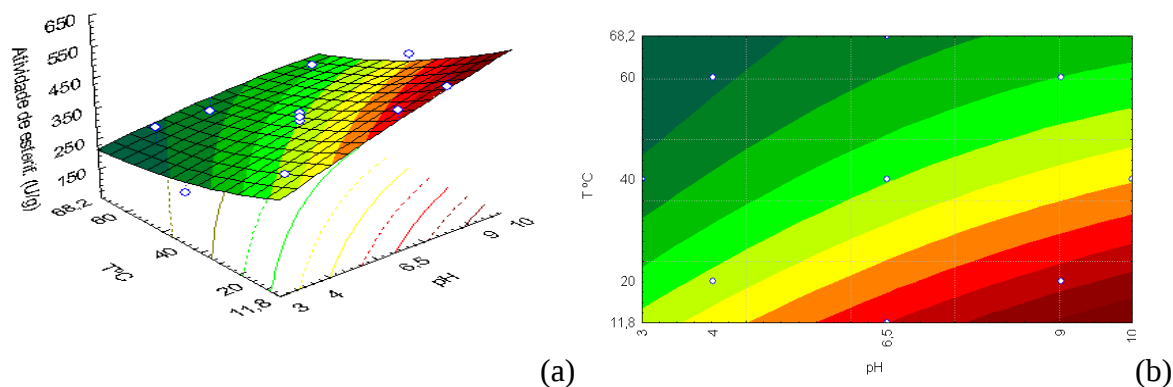


Figura 13- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a avaliação do comportamento da lipase produzida em diferentes temperaturas e memórias de pH para o substrato FA.

Resultados semelhantes a estes obtidos no extrato enzimático do FA foram encontrados por Rajendran *et al.* (2009b). Segundo esses autores, algumas lipases têm mostrado uma considerável estabilidade em uma ampla faixa de valores de pH. Uma lipase alcalina isolada a partir *Pseudomonas nitroreducens* foi ativada em pH 11,0. Em geral, eles são ativos sob o pH de 6,5 a 7,0 e até 8,0. Devido à sua especificidade, as lipases podem ser usadas para isolar os ésteres e álcoois opticamente puros.

Gutarra *et al.* (2009) estudando a caracterização de lipase obtida por FES em torta de babaçu a partir do fungo *Penicillium simplicissimum*, encontraram as mais altas atividade de hidrólise enzimática utilizando níveis de temperatura entre 45 e 50 °C e pH 4-6, usando um DCCR.

Quando uma nova cepa de *Penicillium* sp. foi isolada e testada para produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) por Wolski *et al.* (2009), a caracterização parcial do extrato bruto enzimático obtido demonstrou atividade ótima em pH 5,5 e 47 °C (15,17 U/mL). O extrato bruto enzimático obtido pela FES apresentou melhor estabilidade em pH 7,0 e 25 °C.

O estudo da estabilidade das enzimas é um dos fatores de grande importância para a indústria, devido ao fato de algumas serem instáveis em determinadas condições de processamento, tornando-as rapidamente inativas. Muitas lipases têm sido caracterizadas em

termos de suas atividades e estabilidades relativas ao pH e temperatura. É importante conhecer sua estabilidade para poder aplicar em condições ideais dos processos de interesse de uso da enzima.

A avaliação do efeito da temperatura e memória de pH foi de grande valia, levando em conta que poucos trabalhos existem, hoje em dia, publicados sobre o assunto. O planejamento de experimentos mostrou-se uma ferramenta valiosa, já que existem interações importantes entre os fatores que não são considerados quando da análise dos efeitos da temperatura e memória de pH individualmente.

4.2.6 PRÉ-PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS OTIMIZADOS

Posterior a caracterização parcial do extrato enzimático bruto, novas fermentações foram conduzidas, levando em consideração as condições ótimas de umidade (60 %) e temperatura (30 °C) e 48 horas de fermentação, para a precipitação dos extratos enzimáticos a serem caracterizados parcialmente. A caracterização foi realizada aos extratos precipitados provenientes das enzimas produzidas por ambos os substratos (FS e FA), utilizando o sulfato de amônio como sal para conduzir a precipitação de proteínas.

A técnica de precipitação das proteínas com sais é considerada uma ferramenta importante para concentração de proteínas. O processo de concentração promove a separação das proteínas da maioria dos demais compostos do meio, facilitando os processos subsequentes (Martins, 2008). A concentração pela adição de sais, como sulfato de amônio, baseia-se no aumento da força iônica, de tal forma que as moléculas protéicas se agregam e precipita (Borzani *et al.*, 2001).

A faixa de concentração de 60-70 % de saturação foi descrita como adequada para precipitação de enzimas produzidas com diferentes micro-organismos e substratos (Silva *et al.* 2011^b).

A Tabela 31 demonstra os níveis de saturação com sulfato de amônio, estudados no presente trabalho e as respectivas atividades de esterificação para o farelo de soja e farelo de arroz em 48 horas de fermentação.

Tabela 32- Níveis de saturação com sulfato de amônio e do extrato bruto e atividades de esterificação para o farelo de soja e farelo de arroz em 48 horas de fermentação

	AE U/g 48 h de fermentação	
	FS	FA
Bruto	201,76	108,13
32%Sat	185,42	54,19
40% Sat	183,60	40,04
60% Sat	209,28	143,16
80% Sat	199,78	136,41

Através da Tabela 31 observa-se que para o farelo de arroz (143,16 U/g) e para o farelo de soja (209,28 U/g), as mais altas atividades de esterificação dos extratos precipitado, foi quando se realizou a precipitação da proteína com 60% de saturação com sulfato de amônio. Os autores Silva *et al* (2011^b) encontram para o extrato concentrado, com 60 % de saturação com sulfato de amônio, obtido da FES de *P. brevicompactum* em farelo de mamona, atividade de esterificação de 111,30 U/g, na condição de 70 % de umidade, meio suplementado com 2 % de óleo de soja a 30 °C e 96 h de fermentação.

De acordo com estudos apresentados por SILVA (2010), a precipitação de lipases com sulfato de amônio em distintas concentrações varia de acordo com as referidas pesquisas. As concentrações indicadas variam de 80 % a 20 % de saturação do sal. Para lipases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* e *Aspergillus niger*, foi usada a concentração de sulfato de amônio de 80 % de saturação. Algumas lipases foram ainda precipitadas com 70 % de saturação, como a de *Antrodia cinnamomea* e *Bacillus* sp. RSJ-1; 60 % a de *Bacillus coagulans* MTCC-6375 ; 40 % para a de *Clostridium tetanomorphum* e 20% a proveniente de *Favobacterium odoratum*.

Observa-se, portanto, que há uma diferença entre as atividades encontradas na literatura, variando de acordo com a condição experimental e o micro-organismo utilizado, o que justifica o confronto criterioso que deve ser realizado entre os resultados obtidos neste trabalho e os citados na literatura.

A partir da escolha do melhor nível de precipitação com sulfato de amônio que foi de 60 % de saturação, partiu-se para a caracterização parcial do extrato precipitado. As enzimas

produzidas foram então, caracterizadas parcialmente em relação à estabilidade em temperaturas altas e baixas, especificidade ao substrato de esterificação (diferentes ácidos graxos e álcoois) e faixas de temperatura de atuação e memória de pH, seguindo sempre as condições otimizadas em fermentações anteriores.

4.2.6.1 Avaliação da especificidade aos substratos enzimáticos precipitados

As atividades lipásicas dos extratos enzimáticos precipitados referentes ao emprego dos ácidos oléico e butírico como substratos para as reações de esterificação utilizando diferentes álcoois estão apresentadas nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

De acordo com a Figura 14 observa-se a maior especificidade do extrato enzimático precipitado farelo de arroz em termos de atividade de esterificação (105,15 U/g), foi da reação do ácido oleico (18 Carbono) como doador de acila com um álcool de cadeia curta, o etanol (2C). Semelhante ao substrato FA, o extrato enzimático precipitado do farelo de soja demonstrou maior especificidade em termos de atividade de esterificação (84,12 U/g) quando o ácido oleico reagiu com pron-1-ol. Este fato, provavelmente está associado a composição dos substratos, pois o farelo de arroz possui em torno de 35 % de ácido oleico em sua composição, enquanto o farelo de soja possui aproximadamente 28,2 % de ácido oleico demonstrando a afinidade da enzima pelo substrato de cadeia longa (18C).

A partir da Figura 15 é possível observar que o emprego do ácido butírico como doador de acila reagindo com metanol como álcool, resultou nas maiores atividades lipásicas, com um pico de atividade em torno de 63,71 U/g para farelo de soja e já para a enzima produzida utilizando farelo de arroz como substrato, foi encontrada atividade de esterificação em torno de 67,57 U/g quando o ácido butírico reagiu com but-1-ol.

O ácido láurico também foi testado como doador de acila nos diferentes álcoois (metanol, etanol, propan-1-ol e butan-1-ol), mas somente apresentou atividade de esterificação quando este ácido reagiu com o álcool butan-1-ol (40,05 U/g) para enzimas produzidas pelo farelo de arroz como substrato. Não foram observadas atividades para as enzimas provenientes de FS com nenhum dos álcoois empregados, metanol, etanol, propan-1-ol ou butan-1-ol. Este fato pode estar associado à maior especificidade da enzima quando precipitada por ácidos de cadeia curta insaturada, como o ácido oleico.

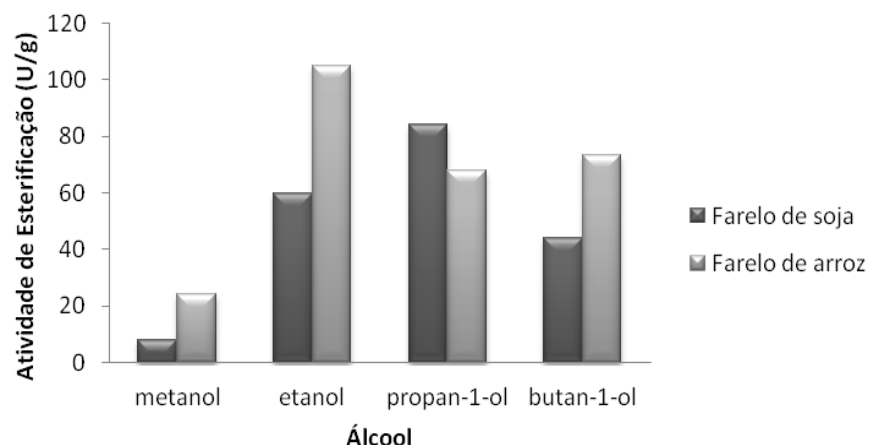


Figura 14- Especificidade do extrato enzimático precipitado(farelo de soja e de arroz) da reação do ácido oleico em diferentes álcoois.

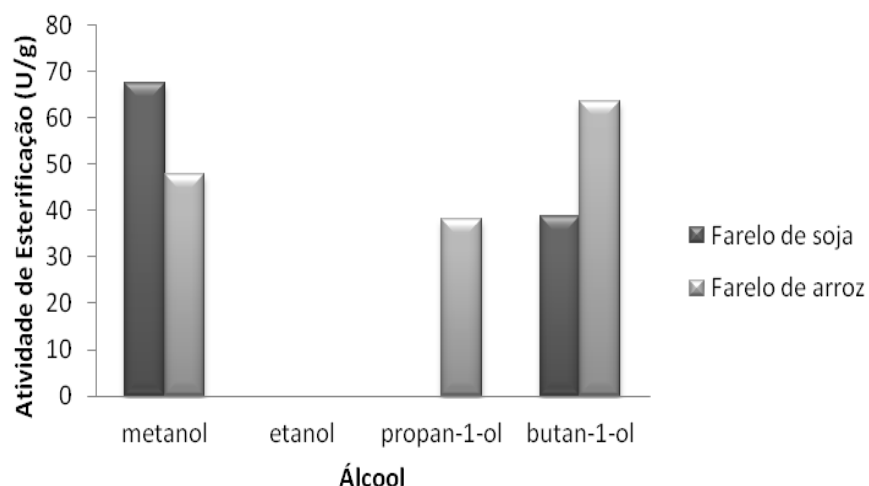


Figura 15- Especificidade do extrato enzimático precipitado (farelo de soja e de arroz) da reação do ácido butírico em diferentes álcoois.

De uma forma geral, os resultados observados aos extratos enzimático bruto e precipitado, obtidos no presente trabalho demonstraram um grande potencial para catalisar reações de esterificação entre alcoóis de cadeia curta (etanol e metanol) e ácidos graxos de cadeia curta (butírico) para o extrato enzimático bruto e ácidos graxos de cadeia longa (oléico) para o extrato enzimático precipitado. Este fato evidencia uma ampla faixa de aplicações para reações de síntese.

4.2.6.2 Avaliação da estabilidade em altas temperaturas dos extratos precipitados

A estabilidade térmica dos extratos enzimáticos precipitados liofilizados, produzidos pelo fungo filamentoso *Penicillium crustosum* utilizando farelo de soja e de arroz como substrato nas temperaturas de 35, 45 e 60 °C foi monitorada, quanto à atividade de esterificação, ao longo de 360 horas, em intervalos de tempos regulares a cada 24 horas.

As Figuras 16, 17 e 18 apresentam a atividade relativa (%) ao longo do tempo de incubação nas temperaturas de 35, 45 e 60 °C, respectivamente.

Para a estabilidade enzimática dos extratos precipitados a 35 °C (Figura 16), observa-se que para o farelo de soja houve um maior pico na atividade relativa nas primeiras 24 h chegando a 118,30 % e mostrando um leve decréscimo até 216 h com 78,08 % de sua atividade relativa e com 360 h é onde se observa a menor atividade (14,66 %). Comportamento semelhante ao farelo de soja foi apresentado pelo extrato enzimático precipitado do farelo de arroz, mostrando um maior pico de atividade enzimática até 24 h de reação com 153,24 % e a menor atividade com 360 h de reação (5,46 %). Duas lipases purificadas foram avaliadas em termos de estabilidade por Sun *et al.* (2009), em relação à atividade hidrolítica, uma das lipases foi extremamente estável na faixa de temperatura de 30-50 °C por um período de incubação de 60 minutos.

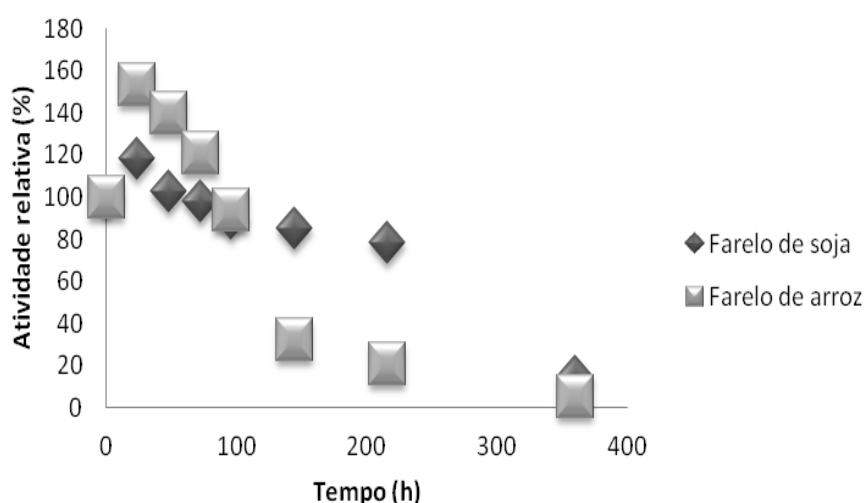


Figura 16- Estabilidade térmica do extrato enzimático precipitado a 35 °C.

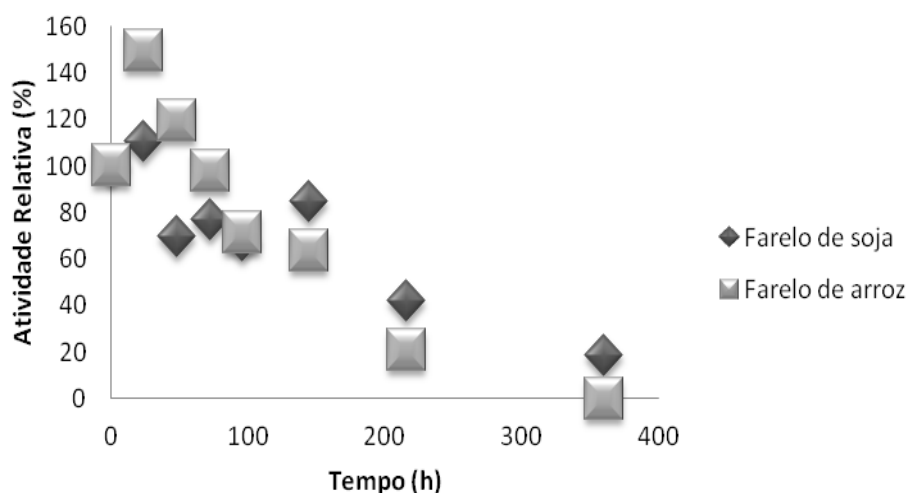


Figura 17- Estabilidade térmica do extrato enzimático precipitado a 45 °C.

De acordo com a Figura 17 observa-se que tanto o extrato precipitado de farelo de soja quanto o farelo de arroz sofreram ativação térmica com um pico de atividade nas primeiras 24 h sendo 110,18 % e 149,65 % de atividade residual, respectivamente. O extrato precipitado do farelo de soja manteve atividade até 360 h (18,45 %) já o farelo de arroz manteve a atividade de esterificação até 216 h sofrendo desativação enzimática após esse período (20,97 %).

Smaniotto (2010) avaliou a estabilidade de lipases produzidas em diferentes meios (industrial e convencional), brutas e precipitadas incubadas em 45 °C. Lipases brutas, convencional e industrial, sofreram uma pequena ativação térmica após 20 horas de incubação (35 e 10 % da atividade inicial, respectivamente). A enzima bruta produzida a partir de meio sintético sofreu desativação completa após 44 horas de incubação e a obtida em meio industrial, após 92 horas. A enzima precipitada convencional apresentou um pequeno aumento de atividade após 44 horas de incubação (10 %) e manteve a atividade até 92 horas, enquanto que a enzima precipitada de meio industrial não apresentou ativação, no entanto manteve a atividade até 116 horas.

Quando incubadas em temperatura de 60 °C (Figura 18), as enzimas produzidas pelos extratos precipitados apresentaram uma ativação térmica na primeiras 24 horas sendo 112,89 % para o farelo de soja e 135,29 % para o farelo de arroz. Para o extrato enzimático produzido pelo farelo de arroz como substrato houve um declínio da atividade relativa em 48 horas de armazenamento (42,64 %) e com 72 horas houve uma ativação térmica novamente mantendo

a estabilidade até 216 horas. Já o extrato precipitado do farelo de soja manteve a atividade de esterificação até 360 horas com 13,06 % em relação a sua atividade inicial. No estudo da estabilidade a 60 °C realizado por Smaniotto (2010), resultados semelhantes foram observados. Todas as enzimas apresentaram uma alta desativação térmica, sendo que a enzima bruta, obtida em meio convencional, mostrou-se a mais sensível à temperatura elevada, apresentando uma desativação total após 44 horas de incubação. As demais enzimas (bruta industrial e precipitada, industrial e convencional) mantiveram a atividade até 92 horas de incubação.

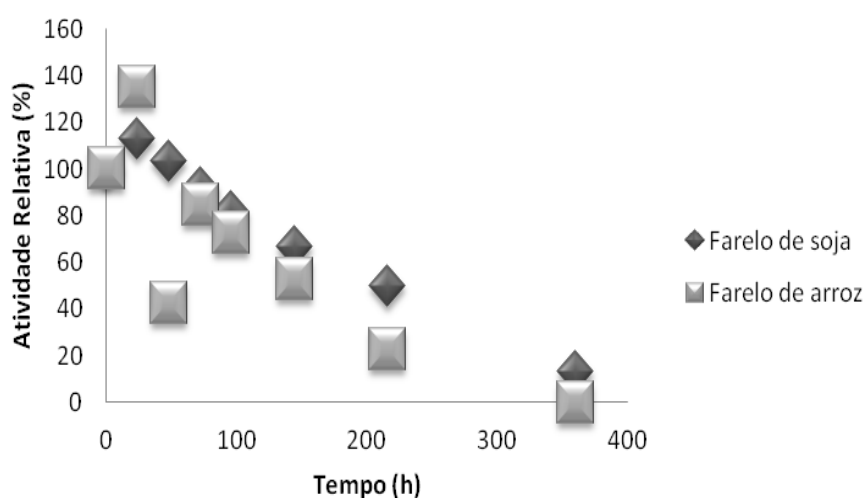


Figura 18- Estabilidade térmica do extrato enzimático precipitado a 60 °C.

De acordo com dados de estabilidade térmica em 35, 45 e 60 °C pode-se analisar que as melhores atividades foram encontradas quando as enzimas estavam incubadas em 35 °C. As condições ótimas de atuação, bem como a estabilidade enzimática em bioprocessos, é um dos fatores de grande importância na escolha de enzimas. Em condições normais, a enzima apresenta uma estrutura nativa e ativa, mantida por um balanço de forças não covalentes (pontes de hidrogênio, forças iônicas, interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, etc.). Em elevadas temperaturas ou outras condições extremas, todas estas forças, com exceção das interações hidrofóbicas, diminuem e a enzima perde atividade por adquirir uma conformação mais desordenada. Na estrutura tridimensional nativa da enzima, o centro ativo consiste em diversos aminoácidos próximos entre si. Assim, o desdobramento da estrutura resulta na perda da atividade do sítio ativo da enzima (Padilha *et al.*, 2011).

Observou-se de uma forma geral que o extrato precipitado do farelo de soja apresentou atividade relativa (%) quando armazenado a 35 °C (14,66%), 45 °C (13,18 %) e 60 °C (10,45 %) até 360 h. Já o extrato precipitado do farelo de arroz apresentou atividade realtiva até 360 h somente quando armazenado a 35 °C (5,46 %). Ambos os substratos apresentaram queda no tempo de armazenamento em temperaturas altas quando comparados aos extratos bruto.

4.2.6.3 Avaliação da estabilidade em baixas temperaturas e temperatura ambiente

Os extratos enzimáticos precipitados produzidos pelo fungo *Penicillium crustosum* utilizando como substrato os farelos de soja e de arroz, foram avaliados segundo a estabilidade durante o armazenamento em refrigeração (4 °C), freezer (-10°C) e temperatura ambiente ao longo de 720 horas (30 dias) conforme demonstrados nas figuras 19, 20 e 21, respectivamente.

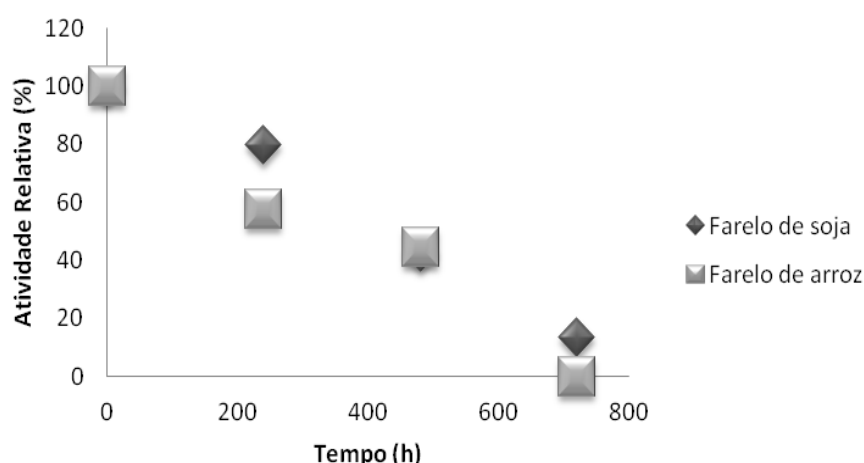


Figura 19- Atividades lipásicas relativas (%) das enzimas ao longo do período de armazenamento em refrigeração (4 °C).

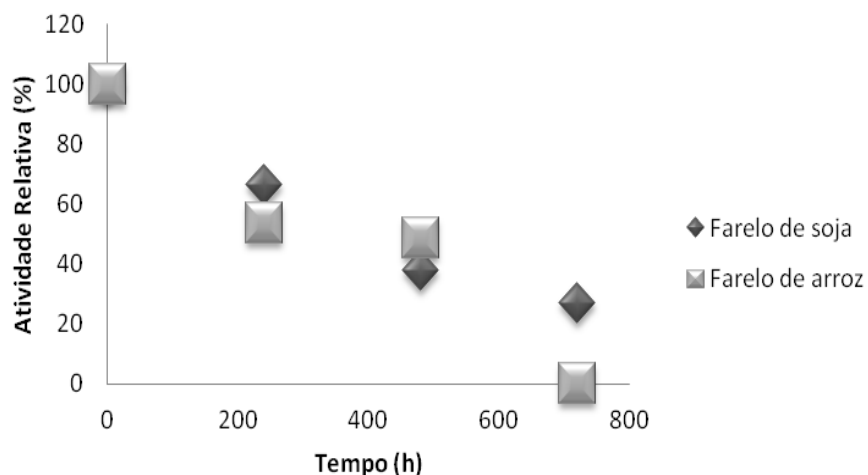


Figura 20- Atividades lipásicas relativas (%) das enzimas ao longo do período de armazenamento freezer (-10 °C).

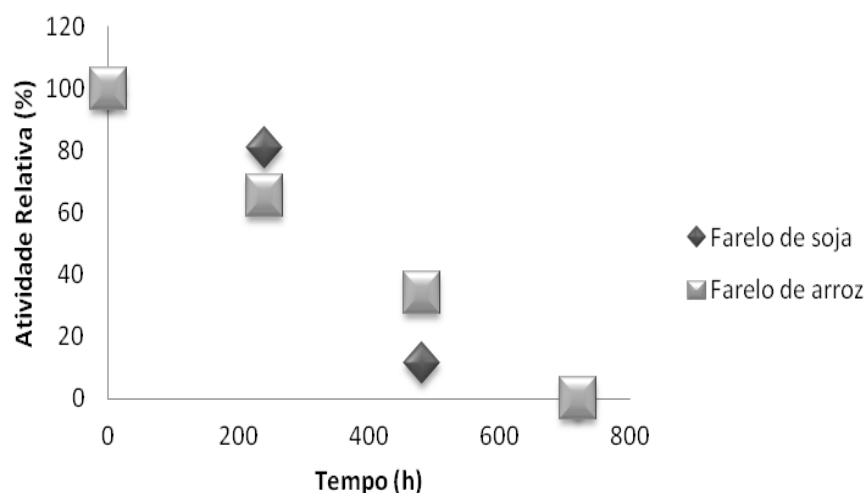


Figura 21- Atividades lipásicas relativas (%) das enzimas ao longo do período de armazenamento em temperatura ambiente.

Através das figuras 19, 20 e 21 nota-se que tanto para o extrato enzimático precipitado do farelo de soja (80,69 %) como para o farelo de arroz (65,43 %) houve um aumento na atividade de esterificação em 240 h (10 dias) quando se mensurou esta atividade frente a estabilidade de armazenamento em temperatura ambiente.

O extrato enzimático precipitado produzido a partir do farelo de arroz apresentou estabilidade em termos de atividade de esterificação somente até 480 h em todas as condições de armazenamento desenvolvidas no trabalho. No entanto, o farelo de soja apresentou pouca estabilidade enzimática até 720 h para geladeira e congelador e somente até 480 h para temperatura ambiente. Demir e Tükel (2009) avaliaram a estabilidade ao longo do armazenamento a temperatura ambiente e 5 °C de uma lipase de *Spirulina platensis* purificada, em relação à atividade de hidrólise. As estabilidades da lipase foram praticamente as mesmas em ambas as temperaturas após 5 dias de armazenamento. Contudo, a lipase reteve 51 % de sua atividade inicial após 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente e 38 % da sua atividade inicial após o mesmo período a 5 °C.

De acordo com os dados apresentados no presente trabalho, em relação a estabilidade enzimática a baixas temperaturas, notou-se que quando se realizou a precipitação dos extratos enzimáticos produzidos por farelo de soja e de arroz houve uma diminuição na estabilidade enzimática. Este fato pode indicar que a precipitação com sais influenciou negativamente no tempo de estabilidade enzimática. Assim foi possível caracterizar as enzimas produzidas em cada substrato, verificando os distintos comportamentos frente a cada forma de estocagem, possibilitando o conhecimento da melhor forma de conservação da enzima frente ao período necessário de estocagem e ou processamentos.

4.2.6.4 Avaliação do efeito da temperatura e memória de pH na atividade lipásica

A avaliação dos efeitos da temperatura e da memória de pH foi realizada para atividade lipásica dos diferentes extratos enzimáticos precipitados obtidos com *Penicilium crustosum* e utilizando resíduos agroindustriais (FS, FA) como substrato.

Delineamentos Completos Centrais Rotacionais 2^2 foram realizados para a determinação do comportamento das enzimas nessas condições, sendo a matriz dos planejamentos bem como os resultados obtidos em termos de atividade esterificação (AE, em U/g) apresentados na Tabela 32.

Tabela 33- Matriz do delineamento experimental (valores reais e codificados) e a resposta em termos de atividade de esterificação avaliando temperatura e memória de pH dos extratos precipitados FS e FA

Ensaio	pH	T (°C)	AE (U/g)	
			FS	FA
1	-1 (4,0)	-1 (20)	102,94	0,00
2	+1 (9,0)	-1 (20)	0,00	0,00
3	-1 (4,0)	+1 (60)	0,00	105,00
4	+1 (9,0)	+1 (60)	55,53	0,00
5	0 (6,5)	-1,41(11,8)	108,29	33,98
6	0 (6,5)	1,41 (68,2)	62,00	64,07
7	-1,41(3,0)	0 (40)	133,87	102,50
8	1,41 (10,0)	0 (40)	121,29	53,33
9	0 (6,5)	0 (40)	23,02	68,63
10	0 (6,5)	0 (40)	23,76	64,77
11	0 (6,5)	0 (40)	22,28	60,91

O pico de atividade de esterificação (U/g) para o extrato do farelo de soja precipitado foi encontrada no ensaio 7 e para o extrato do farelo de arroz precipitado foi no ensaio 3 seguido do ensaio 7.

A partir desses dados realizou-se a análise estatística, onde se observou através da Tabela 33 que nenhuma das variáveis estudadas para o extrato farelo de soja precipitado (memórias de pH e Temperatura) apresentaram diferença significativa, já para o extrato enzimático precipitado do farelo de arroz o pH apresentou efeito negativo significativo com 90 % de confiança, apesar de ter ocorrido o pico de atividade enzimática em ambos os substratos em pH ácidos e temperaturas mais elevadas.

Tabela 34- Coeficientes de regressão para atividade de esterificação (U/g) dos extratos precipitados do farelo de soja e de arroz

	Coeficiente regressão		Erro Puro		t(5)		p	
	FS	FA	FS	FA	FS	FA	FS	FA
Média	23,34	23,34	30,08	15,10	0,77	4,29	0,47	0,00
(1)pH (L)	-26,17	-26,17	36,89	18,52	-0,70	-2,35	0,50	0,06
pH (Q)	89,11	89,11	44,02	22,10	-0,70	-0,25	0,50	0,80
(2)T (L)	-31,31	-31,31	36,80	18,52	-0,70	1,99	0,50	0,10
T (Q)	25,16	25,16	44,02	22,10	-0,70	-1,56	0,50	0,17
1L * 2L	79,23	79,23	52,10	26,15	-0,70	-2,00	0,51	0,10

De forma geral os dados para memória de pH e temperatura do extrato precipitado para o farelo de soja e para o farelo de arroz, mostraram diferenças bem significativas quando comparados com o extrato bruto para ambos os farelos estudados no decorrer do trabalho. Pois os extratos bruto mostraram maiores atividades de esterificação (U/g) em temperaturas mais baixas e memória de pH tendendo a alcalinidade, enquanto os extratos precipitados apresentaram pico de atividade de esterificação (U/g) em temperaturas mais altas e memória de pH mais ácidos, mostrando resultados em termos de atividade de esterificação mais baixos dos que encontrados em extratos brutos.

Observou-se, de uma maneira geral, que a precipitação por sulfato de amônio afetou de forma negativa a caracterização das lipases produzidas por *Penicilium crustosum* nos substratos testados no decorrer do trabalho, podendo este sal ter desnaturado a proteína, modificando assim sua conformação estrutural, não havendo necessidade de fazer a saturação da proteína, pois esta técnica aumenta os custos e demanda mais tempo na realização do experimento.

Sabe-se que o sulfato de amônia saturado altera as características estruturais das proteínas fazendo com que as mesmas percam a capacidade de se tornarem solúveis, sendo assim, na presença deste as proteínas precipitam.

Após o estudo da otimização da produção, caracterização parcial do extrato bruto e caracterização parcial do extrato precipitado obtidos em diferentes substratos e o fungo *P. crustosum*, analisou-se também a otimização da produção de enzimas lipolíticas obtidas a partir da levedura *S. ruberrimus* em diferentes matérias-primas.

4.3 PRODUÇÃO DE LIPASES OBTIDAS POR FES UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATOS A PARTIR DA LEVEDURA *S. ruberrimus*

Previamente à otimização da produção de lipase, foi realizado um ensaio cinético empregando os substratos investigados. O micro-organismo foi inoculado inicialmente em farelo de soja, baseando-se nas condições estabelecidas por Vargas *et al.* (2008). Através da avaliação cinética de produção para a lipase microbiana produzida por diferentes substratos ao longo de 120 horas de fermentação, pode se observar que as maiores atividades de esterificação por FES para a levedura *Sporobolomyces ruberrimus* foram de 116,35 (em 72 h); 128,88 (em 48 h) e 269,39 (em 48 h) U/g de substrato seco (gs) para bagaço de cana, farelo de arroz e farelo de soja, respectivamente.

Observou-se para o bagaço de cana a necessidade de um maior tempo de fermentação (72 h) para atingir a máxima atividade de esterificação, quando comparado aos outros dois substratos (48 h de fermentação). Isso pode estar relacionado com a composição dos mesmos, conforme demonstrado na Tabela 12, sendo que o BC é o mais pobre dos substratos investigados. Desse modo, esse tempo foi fixado para a realização dos planejamentos experimentais.

Como conclusão parcial pode-se considerar que a utilização de suplementações como fonte de nitrogênio e fonte de carbono, com o objetivo de aumentar o teor nutricional dos substratos (FS, FA e BC) se fez desnecessária nos planejamentos, sendo que bons resultados preliminares foram obtidos, comparados com os existentes na literatura, com e sem adição de suplementos, favorecendo a produção de uma enzima viável economicamente. Portanto, pode-se considerar que ambos os substratos apresentam suficientes fontes para produção da enzima, dispensando a suplementação com fontes externas.

4.3.1 Otimização da produção de lipase

De acordo com os resultados obtidos para o ensaio preliminar, a otimização da produção de lipase por *S. ruberrimus* foi realizada em 48 horas de fermentação para farelo de soja e farelo de arroz e em 72 horas de fermentação para bagaço de cana. A umidade e

temperatura da fermentação em estado sólido foram às variáveis avaliadas e a atividade de esterificação (AE) do extrato enzimático liofilizado, foi à resposta. Para que as condições de produção de lipases pela levedura fossem otimizadas, foram realizados Delineamentos Completos Centrais Rotacionais 2² (DCCR) para cada um dos substratos investigados. As faixas de estudo foram ajustadas, em função dos resultados obtidos por Vargas *et al.* (2008) e dos testes preliminares realizados previamente.

A Tabela 34 apresenta os valores reais e codificados das variáveis independentes (umidade e temperatura) e as respostas em termos de atividade lipásica em 48 horas de fermentação para farelo de soja e farelo de arroz e 72 horas de fermentação para bagaço de cana.

Tabela 35- Matriz dos DCCR (valores codificados e reais com as respostas em termos de atividade lipásica) para avaliação dos diferentes substratos, após 48 horas de fermentação para FS e FA e 72 horas de fermentação para BC

Ensaio	Umidade (%)	Temperatura (°C)	AE (U/g)		
			FS	BC	FA
1	-1 (50)	-1 (20)	97,17	150,53	202,45
2	+1 (70)	-1 (20)	98,7	119,13	109,09
3	- 1 (50)	+1 (40)	19,29	43,68	111,93
4	+1 (70)	+1 (40)	33,3	43,26	110,25
5	-1,41(46)	0(30)	66,45	119,51	172,83
6	+1,41(74)	0(30)	127,27	56,41	91,86
7	0(60)	-1,41(16)	143,48	60,35	99,28
8	0(60)	+1,41(44)	0	13,14	21,69
9	0(60)	0(30)	125,76	163,77	189,54
10	0(60)	0(30)	130,13	169,33	191,1
11	0(60)	0(30)	134,5	159,47	187,98

É possível observar que a maior atividade lipásica para FS (143,48 U/g) foi obtida no ensaio 7, seguida das atividades referentes aos pontos centrais (125,76, 130,13 e 134,5 U/g), obtidas nos ensaios 9, 10 e 11 respectivamente. O bagaço de cana apresentou os maiores valores de AE (163,77, 169,33 e 159,47 U/g, nos ensaios 9, 10 e 11 respectivamente) nos

pontos centrais. A melhor resposta para a enzima produzida utilizando farelo de arroz como substrato foi obtida no primeiro ensaio (202,45 U/g). Contudo, a atividade lipásica obtida nessa condição experimental é bastante similar à atividade referente aos pontos centrais, sendo esta a segunda melhor resposta (189,54,191,1 e 187,98 U/g, nos ensaios 9,10 e 11, respectivamente).

As atividades lipásicas máximas se deram nas condições do ponto central ou seguidas dos mesmos, no entanto, as menores atividades foram obtidas nas condições experimentais referente ao ensaio 8 para FS, BC e FA, provavelmente devido à alta temperatura.

Nota-se que o micro-organismo tende a secretar maiores quantidades de enzima nos níveis intermediários de umidade e em temperaturas intermediárias, seguidas das menores. Isso pode estar atribuído à dificuldade de transferência de massa e calor em altos níveis de umidade. O efeito da temperatura na fermentação pode estar relacionado ao fato de que uma maior temperatura leva a uma elevada queda de umidade no meio. Como já observado por outros autores, extremos de temperatura e umidade reduzem a produção de lipases (Kamini *et al.*,1998).

Com a análise estatística dos planejamentos completos foi possível obter modelos empíricos para a atividade lipásica em função da temperatura e da umidade, para cada tempo de fermentação analisado. Os modelos codificados otimizados para 48 horas (FS e FA) e 72 horas (BC), respectivamente, podem ser visualizados nas Equações 10, 11 e 12 para a atividade lipásica e foram validados pelas análises de variância (ANOVA), apresentadas nas Tabelas 35, 36 e 37, para FS, FA e BC, respectivamente.

$$AE48FS = 130,22 + 12,69 U (L) - 22,29 U^2 - 43,32 T (L) - 34,92 T^2 + 3,11 U (L) * T(L)$$

Equação 10

Onde:

AEFS= Atividade de esterificação em 48h de fermentação com farelo de soja (FS) ;

T= Temperatura;

U= Umidade.

$$AE48FA = 189,39 - 26,22 U(L) - 19,24 U^2 - 24,91 T (L) - 55,38 T^2 + 22,91U (L) * T(L)$$

Equação 11

Onde:

AEFA= Atividade esterificação em 48h de fermentação com farelo de arroz (FA);

T= Temperatura;

U= Umidade.

$$AE72BC = 164,12 - 15,74 U (L) - 31,69 U^2 - 36,8 T (L) - 51,59 T^2 + 7,74U (L) * T(L)$$

Equação 12

Onde:

AEBC= Atividade lipásica em 72h de fermentação com bagaço de cana (BC);

T= Temperatura;

U= Umidade.

Observa-se que os coeficientes de correlação obtidos (0,92, 0,91 e 0,94, respectivamente) e o valor de F calculado (2,2 vezes maior que o F tabelado para as atividades em 48 h de fermentação utilizando FS, 2,0 vezes para 48 h, utilizando FA e 3,4 vezes para 72 h, utilizando BC) permitiram a validação dos modelos matemáticos com 95 % de confiança. Com os modelos validados foi possível construir as superfícies de resposta que são apresentadas juntamente com as curvas de contorno na Figura 22, 23 e 24.

Tabela 36- Análise de variância para atividade lipásica no tempo de 48 h utilizando FS

Fontes de Variação	SQ	GL	SQM	F Calculado
Regressão	24030,78	5	4806,15	11,61
Resíduos	2068,43	5	413,68	
Total	26099,21	10		

Coeficiente de correlação: R=0,92 Ftab,95 % = 5,05

Tabela 37- Análise de variância para atividade lipásica no tempo de 48 h utilizando FA

Fontes de Variação	SQ	GL	SQM	F Calculado
Regressão	29786,12	5	5957,22	10,22
Resíduos	2913,25	5	582,65	
Total	32699,37	10		

Coeficiente de correlação: R=0,91; Ftab,95 % = 5,05

Tabela 38- Análise de variância para atividade lipásica no tempo de 72 h utilizando BC

Fontes de Variação	SQ	GL	SQM	F Calculado
Regressão	29637,49	5	5927,49	17,17
Resíduos	1725,12	5	345,02	
Total	31362,61	10		

Coeficiente de correlação: R=0,94; Ftab,95 % = 5,05

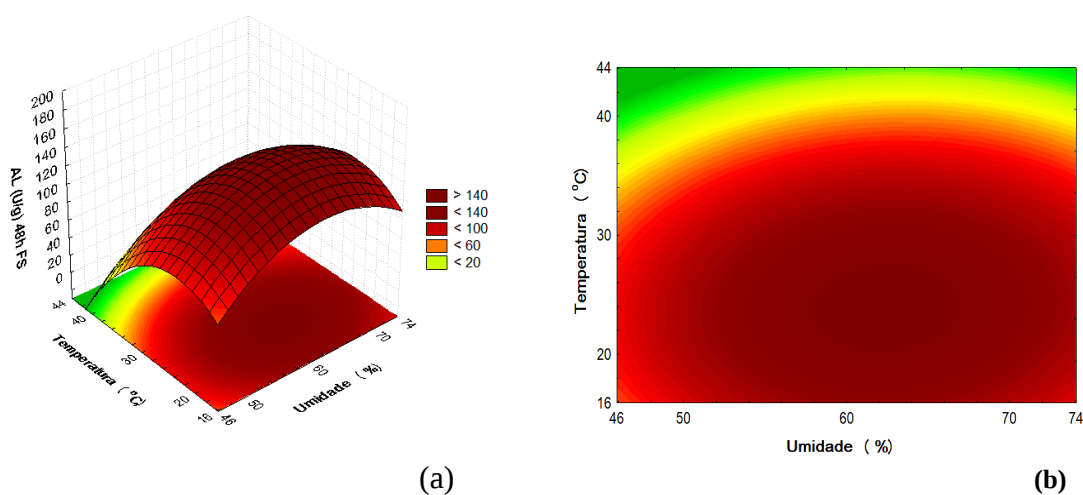


Figura 22- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de esterificação em 48 horas de fermentação e utilizando farelo de soja como substrato.

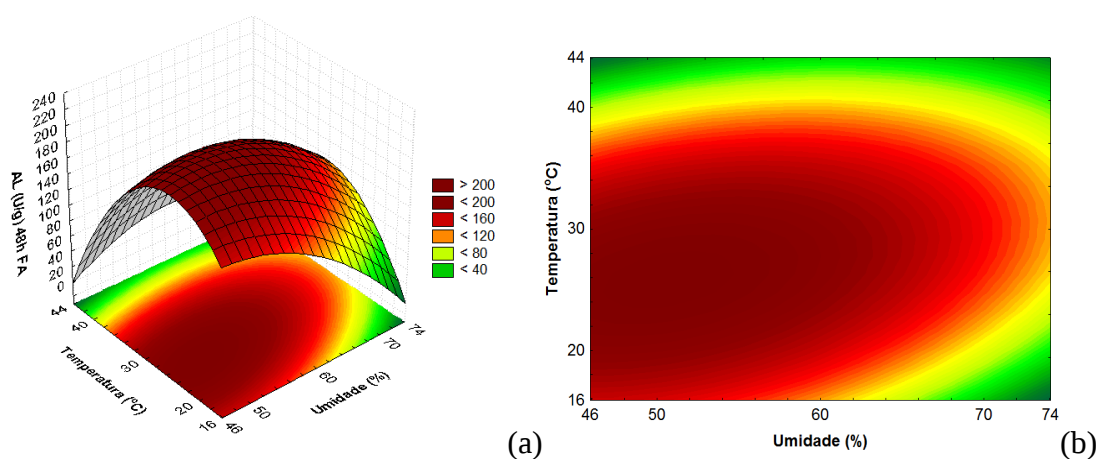


Figura 23- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de esterificação em 48 horas de fermentação e utilizando farelo de arroz como substrato.

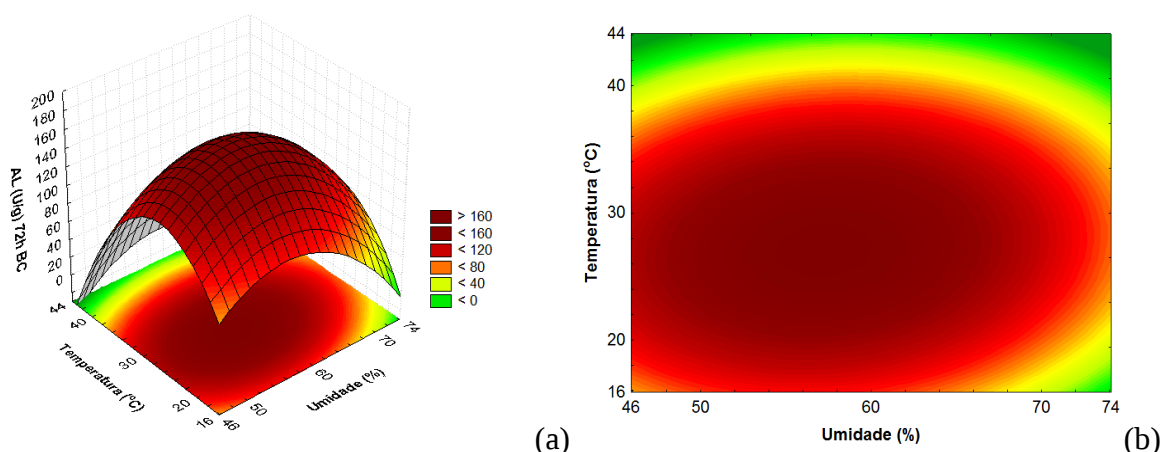


Figura 24- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de esterificação em 72 horas de fermentação e utilizando bagaço de cana como substrato.

As superfícies de resposta mostram que em ambos os casos a maior (BC) ou a segunda maior atividade lipásica (FS e FA) se encontra em torno do ponto central o que determina a otimização da produção da enzima nas faixas estudadas ($T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $U=60\%$), o que pode ser melhor observado nas curvas de contorno. Através desta análise fica evidente que extremos de temperatura e umidade tendem a reduzir a produção de lipase, uma vez que baixas temperaturas reduzem a atividade metabólica e altas temperaturas podem levar à desativação enzimática. A umidade em níveis muito baixos prejudica a transporte de nutrientes e toxinas através da membrana e pode causar a perda das propriedades funcionais de enzimas da cadeia metabólica celular (Gervais e Molin, 2003).

O excesso de umidade reduz a porosidade do substrato prejudicando a transferência de calor e de oxigênio (Gutarra *et al.*, 2005; Pandey, 2003; Mitchell *et al.*, 2003; Mahadik *et al.*, 2002). Embora a presença da água seja uma necessidade para o micro-organismo em diversas funções, esta análise demonstra a importância de um controle nesse parâmetro.

A temperatura e a composição dos substratos (carbono, nitrogênio, minerais e pH) também devem ser levados em consideração, pois podem ativar ou inibir a produção da enzima. Portanto, é interessante ainda ressaltar que a produção das lipases está relacionada à área total do substrato e a faixa de pH ideal está associada com a ativação do sítio catalítico das hidrolases (Fojan *et al.*, 2000).

No estudo realizado por Kempka *et al.* (2008) os autores encontraram condições de temperatura de 30 °C e pH 7,0 como melhor condição para produção de lipases por *Penicillium verrucosum*.

A produção de lipase é influenciada pelo conteúdo de carbono no meio quando este é de origem lipídica (Mahadik *et al.*, 2002). Segundo alguns trabalhos publicados, este comportamento está diretamente relacionado ao mecanismo de regulação do micro-organismo em estudo. Assim, alguns casos relatam que a suplementação do meio com lipídios não é eficiente (Kamini *et al.*, 1998). Kiran *et al.* (2008) mostram que a suplementação de 1 % de tributirina proporcionou a produção máxima da lipase alcalina de *Pseudomonas* sp. No entanto, ao adicionar outras fontes de carbono complementar, ocorria a redução da produção, o que foi atribuído à repressão catabólica pela fonte de carbono disponível no meio de cultura.

Wang *et al.* (2008) relatam ainda que a produção de lipase pode ser induzida por diferentes substratos lipídicos, mas o mecanismo envolvido ainda está sob investigação. O papel destes substratos na sua síntese e secreção ainda está pouco esclarecido.

O impacto do conteúdo de umidade na matriz sólida é definido através das diferenças dos produtos formados na fermentação, pois este afeta a homogeneidade de crescimento da cultura (Chinn *et al.*, 2008). O alto conteúdo de umidade inicial na matriz sólida da fermentação mostra-se necessário, uma vez que desde o momento do inóculo até o final da fermentação, este diminuirá devido à evaporação acarretada pelo calor metabólico, ressaltando a necessidade de um balanceamento do conteúdo de água no substrato suporte da FES (Chinn *et al.*, 2008).

Alguns fatores devem ser ajustados para aumentar o desempenho da FES, de acordo com a especificidade do micro-organismo e do substrato utilizado, contribuindo para a secreção da enzima (Couto e Sanromán, 2006). Deve-se considerar ainda que a porosidade do leito da fermentação em estado sólido e a área superficial estão diretamente relacionadas com a taxa de oxigênio distribuído e o espaço entre as partículas de substrato.

Estudos publicados referentes à produção de lipases em FES indicam a necessidade de 70 % de umidade em suporte inerte (Avincel) (Chinn *et al.*, 2008) em torta de babaçu (Azeredo *et al.*, 2007; Gutarra *et al.*, 2005; Palma *et al.*, 2000) e em farelo de soja (Di Luccio *et al.*, 2004). Em FES com bagaço de cana de açúcar, a umidade utilizada foi 75 %, alcançando bons resultados de produtividade (Rodriguez *et al.*, 2006). Godoy *et al.* (2009) verificaram que a produtividade aumenta em elevadas a_w , sendo que após 48 h de

fermentação, o decréscimo da umidade e a_w foram observados e, em consequência, a atividade lipásica.

Condições ótimas para produção de lipases microbianas é de extrema importância sob a ótica industrial, pois permite que a produção da enzima seja realizada em uma faixa de concentração dos componentes do meio, permitindo oscilações destas no processo, dentro da área estudada.

CAPÍTULO 5

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste capítulo serão apresentadas as principais conclusões realizadas durante o experimento obtidas pelo fungo *P. crustosum* e pela levedura *S. ruberrimus* por FES utilizando diferentes resíduos agroindustriais como matéria-prima.

5.1 Fungo filamentosso *Penicillium crustosum*

- Mostrou-se um micro-organismo promissor para produção de lipases utilizando resíduos agroindustriais como substrato.

- Na avaliação e diferentes substratos para a produção lipásica, observou-se que as maiores atividades de esterificação foram de 152,46 (em 72 h); 174,80 (em 48 h) e 112,28 (em 48 h) U/g de substrato seco para farelo de algodão, farelo de soja e farelo de arroz, respectivamente.

- Após a avaliação estudou-se a otimização do processo de produção da lipase em termos de atividade de esterificação, utilizando quatro diferentes substratos (farelo de soja, de arroz, de caroço de algodão e bagaço de cana), verificando o efeito de duas variáveis (umidade e temperatura) para cada substrato. A condição otimizada, de acordo com as variáveis avaliadas, 60 % de umidade e temperatura de 30°C, conduziu a atividades máximas de 116,30 U/g (farelo de soja); 136,16 U/g (farelo arroz); 192, 93 U/g (caroço de algodão) e para bagaço de cana de 107,96 U/g em 48 h de fermentação. Em 72 horas de fermentação, atividades de 203,94 U/g (farelo soja); 172,54 U/g (farelo arroz); 158,68 U/g (caroço de algodão) e 111,37 U/g (bagaço de cana) foram obtidas.

- A partir desses resultados avaliou-se o efeito da suplementação dos farelos de soja e de arroz para se atingir a maximização da produção de lipase. Através da técnica de planejamento seqüencial de experimentos foi possível otimizar o processo em termos de

atividade de esterificação para cada substrato testado: 1,5 % (p/p) de azeite de oliva e 5,5 % (p/p) de uréia no farelo de soja e 5,5 % (p/p) de AMM no farelo de arroz.

- Na caracterização enzimática parcial do extrato bruto foram encontrados os seguintes resultados:

a) Avaliação da especificidade frente ao substrato esterificação: Foi possível observar que o emprego do ácido butírico e do ácido oleico como doadores de acila reagindo com metanol como álcool, resultou nas maiores atividades lipásicas, com um pico de atividade de 604,95 U/g e de 567,19 U/g para a enzima produzida utilizando FS e de 592,65 U/g e 562,13 U/g para a enzima produzida quando se utilizou FA como substrato, respectivamente.

b) Avaliação da estabilidade em altas temperaturas: tanto os extratos enzimáticos do farelo de soja quanto do farelo de arroz mostraram maior estabilidade em termos de atividade de esterificação (U/g) em temperaturas de 35 °C.

c) Avaliação da estabilidade em baixas temperaturas e temperatura ambiente: Os extratos enzimáticos do farelo de soja e do farelo de arroz mostraram estabilidade durante 30 dias em temperatura de refrigeração e 20 dias em temperatura de congelamento.

d) Avaliação do efeito da temperatura e memória de pH: os dois substratos testados mostraram resultados semelhantes, ou seja, melhores atividades em temperaturas baixas (11,8 °C) e pH em torno de 6,5 tendendo para alcalinidade.

- Na caracterização enzimática parcial do extrato precipitado foram encontrados os seguintes resultados:

a) Avaliação da especificidade frente ao substrato esterificação: foi possível observar que o emprego do ácido oleico como doadores de acila reagindo com etanol como álcool, resultou nas maiores atividades lipásicas, com um pico de atividade de 105,15 U/g para a enzima produzida utilizando FA e para a enzima produzida quando se utilizou FS como substrato a maior atividade de esterificação foi 84,12 U/g quando houve a reação do ácido oléico com o álcool *propan-1-ol*.

b) Avaliação da estabilidade em altas temperaturas: tanto os extratos enzimáticos do farelo de soja quanto do farelo de arroz mostraram maior estabilidade em termos de atividade de esterificação (U/g) em temperaturas de 35 °C.

c) Avaliação da estabilidade em baixas temperaturas e temperatura ambiente: Os extratos enzimáticos do farelo de soja e do farelo de arroz mostraram estabilidade em temperatura ambiente.

d) Avaliação do efeito da temperatura e memória de pH: os extratos precipitados apresentaram pico de atividade de esterificação (U/g) em temperaturas mais altas e memória de pH mais ácidos.

5.2 Levedura *Sporobolomyces ruberrimus*

- A estratégia de fermentação em estado sólido empregada neste trabalho foi eficiente para a produção de lipase pela nova cepa de *Sporobolomyces ruberrimus* isolada, obtendo-se boas atividades lipásicas para diferentes resíduos agroindustriais utilizados como substrato.

- Os substratos investigados, farelo de soja, farelo de arroz e bagaço de cana, conduziram a promissores resultados em termos de atividade de esterificação para as lipases produzidas. A condição otimizada, de acordo com as variáveis avaliadas foi 60% de umidade e temperatura 30°C.

- As atividades lipásicas referentes aos pontos centrais, para as enzimas produzidas com farelo de soja foram 125,76, 130,13 e 134,5 U/g. O bagaço de cana como substrato conduziu aos maiores valores para as atividades lipásicas de 163,77, 169,33 e 159,47 U/g, nos ensaios referentes a região do ponto central . A melhor resposta para a enzima produzida utilizando farelo de arroz como substrato foi de 202,45 U/g obtida no primeiro ensaio (T=20 % e U=50 %). Contudo, a atividade lipásica obtida nesta condição experimental é bastante similar às atividades referentes aos pontos centrais, sendo estas a segunda melhor resposta (189,54, 191,1 e 187,98 U/g), demonstrando a preferência dessas enzimas por faixas intermediárias de umidade e temperatura.

A utilização dos resíduos agroindustriais como fontes alternativas de substratos para produção de enzimas podem auxiliar na redução da poluição ambiental, além de reduzir o custo global de produção de enzimas microbianas, levando em conta que o Brasil é um país rico, em se tratando destes resíduos, o que justifica a investigação dos mesmos na obtenção de produtos de alto valor agregado.

5.3 Sugestões para trabalhos futuros

- Estudar o aumento de escala na FES com as condições maximizadas neste trabalho incluindo a otimização de variáveis ambientais de fermentação como, pH, agitação e aeração;
- Estudo de otimização da produção de lipase, incluindo a avaliação de outros resíduos agroindustriais, por meio da técnica de planejamento de experimentos;
- Aprimoramento da metodologia empregada para a determinação da atividade de esterificação;
- Estudo de aplicação das enzimas obtidas em reações de esterificação.

CAPÍTULO 6

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas H. E, Comeau L.; Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003; 32:589-595

Alkan H, Baysal Z, Uyar F, Dogru M.; Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2006:136,183-192.

Benjamin S., Pandey A., Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Biology and Technology*, 2000:43, 453-460.

Bernardes O.L., Bevilaqua J.V., Leal M.C.M.R., Freire, D.M.G., Lagnone, M.A.P.; Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007:136-140, 105-114.

Borzani W., Shmidell W., Lima U.A., Aquarone E. *Biotecnologia industrial: fundamentos*. São Paulo: Edgar Blucher, 2001, 254p.

Brígida A.I.S., Estudo da imobilização de lipase tipo B de *Candida* Antartica utilizando fibra da casca de coco verde como suporte. Fortaleza: 2006. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará

Brozzoli V., Crognale S., Sampedro I., Federici F., D'annibale A., Petruccioli M.; Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresource Technology*. 2009:100, 3395-3402.

Campos R.L.M, Hierro E., Ordoñez J.A., Bertol T.M., Terra N.N, L. de la Hoz; Fatty acid and volatile compounds from salami manufactured with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract and pork back fat and meat from pigs fed on diets with partial replacement of maize with rice bran. Food Chemistry, 2007:103, 1159–1167.

Carvalho P.O., Campos P.R.B., Noffs M.A., Oliveira J.G., Shimazu M.T., Silva D.M.; Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. Química Nova, 2003:26,75-80.

Casa R.M., Sinisterra J.V., Sanchez-Montero J.M.; Characterization and catalytic properties of a new crude lipase from *C. rugosa*. Enzyme and Microbial Technology, 2006: 38, 599-609.

Castilho L.R., Polato C.M.S., Buarque E.A., Sant’Anna Jr. G.L., Freire D.M.G.; Ecomomic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state submerged fermentations. Biochemical Engineering Journal, 2000:4, 239-247.

Castro H. F. E, Anderson W. A.; Fine chemicals by biotransformations using lipases. Química Nova. 1995:6, 6-15.

Cheirsilp B., Jeamjounkhaw P., H-kittikun A; Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2009:59, 206–211.

Chinn M.S., Nokes S.E., Strobel H.J.; Influence of moisture content and cultivation duration on *Clostridium thermocellum* 27405 end- product formation in solid substrate cultivation on Avicel. Bioresource Technology. 2008:99, 2664-2671.

Christen P., Angeles N, Farres A., Revah S.; Lipase production by *Rhizopus delemar* grown on a synthesis support in solid fermentation. Proceedings of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation, Kluwer Academic Publishers, 1997.

Cordova J., Nemmaoui M., Ismaïli–Alaoui M., Morin A., Roussos S., Raimbault M., Benjlali B.; Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1998;5, 75-78.

Costa M. A., Peralta R. M.; Production of lipases by soil fung and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). *Journal of Basic Microbiology*, 1999;39, 11-15.

Couto S.R., Sanromán M.A.; Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering*, 2005;76, 291-302.

D'annibale A., Sermanni G.G., Federici F., Petruccioli M.; Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource Technology*. 2006;97, 1828–1833.

Dai D, Xia L.; Enhanced Production of *Penicillium expansum* PED-03 Lipase through Control of Culture Conditions and Application of the Crude Enzyme in Kinetic Resolution of Racemic Allethrolone. *Biotechnology Progress*. 2005;21, 1165-1168.

Dalla-Vecchia R., Nascimento M. G., Soldi V.; Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, 2004;27: 4, 623-630.

Damaso M.C.T., Passianoto M.A., Freitas S.C., Freire DMG., Lago R.C.A., Couri S.; Utilization of Agroindustrial Residues for Lipase production by Solid-State Fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2008;39, 676-681.

Demir B. S. E., Tükel S. S.; Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009, DOI:10.1016/j.molcatb.2009.09.011.

Di Luccio M., Capra F., Ribeiro N.P., Vargas G.D.L.P., Freire D.M.G., Oliveira D.; Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state

fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004:113-116, 173-180.

Diaz J.C., Rodriguez 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, 2006:39, 1042-1050.

Dizgea N., Keskinlera B., Tanrisevenb A; Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene–divinylbenzene copolymer. Biochemical Engineering Journal. 2009:44, 220–225.

Dominguez A., Costas M., Longo, M.A., Sanromán A.; A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. Biotechnology Letters. 2003:25, 1225-1229.

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 *Aspergillus niger* using digital image processing. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2008:147, 63-75.

Dutta S, Ray L.; Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C(7). Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009.

Ellaiah P., Prabhakar TT. , Ramakrishna B., Thaer Taleb A., Adinarayana K.; Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. Process Biochemistry, 2004:39, 525-528.

Ertugrul S., Dönmez G., Takaç S.; Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. Journal of Hazardous Materials, 2007:149, 720-724.

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

Ferraz L.R., Oliveira D.S, Silva M.F., Treichel H., Oliveira D.; Produção de lipase microbiana por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais. 3º Simpósio de Segurança Alimentar. Anais 3º Simpósio de Segurança Alimentar, Florianópolis, 2010(a).

Ferraz L.R., Produção e caracterização parcial de lipases de *sporobolomyces ruberrimus* utilizando como substratos resíduos agroindustriais. Erechim, 2010 (b). Dissertação de mestrado. Departamento de ciências Agrárias, Erechim.

Ferraz L.R., Oliveira D.S, Rigo E., Silva M.F., Predabon S., Di Luccio M., Oliveira D, Treichel H.; Lipases Production by *Sporobolomyces ruberrimus* under Solid state Fermentation using Soybean Meal and Sugarcane bagasse as substrate. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Caxias do Sul, 2011.

Fickers P., Destain J., Thonart,P.; Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase production by fed-batch fermentation. *Journal of Basic Microbiology*, 2009:49, 212-215.

Fojan P., Jonson P.H., Petersen M.T.N., Petersen S.B.; What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie*, 2000:82, 1033-1041.

Freire D.M.G., Castilho L.R.; Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. *Revista Brasileira de Farmacologia*, 2000:81, 48-56.

Freire D.M.G.; Seleção de micro-organismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*. Rio de Janeiro: 1996. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica, IQ/UFRJ.

Fukuda H., Kondo A., Noda H.; Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001:92, 405-416.

Germano S., Pandey A., Osaku C.A., Rocha S.N., Soccol C.R.; Characterization and Stability of protease from *Penicillium* sp. Produced by solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003: 32, 246-251.

Godoy M.G., Gutarra M.L.E., Maciel F.M., Felix S.P., Bevilaqua J.B., Machado O.L.T., Freire D.M.G.; Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production, *Enzyme and Microbial Technology*, 2009:44, 317-322.

Gombert A.K., Pinto A.L., Castilho L.R., Freire D.M.G.; Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*, 1999: 35, 85-90.

Gonçalves F.A.G., Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso. Belo Horizonte, 2007. Dissertação de Mestrado. Depto. de Ciências de Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais.

Griebeler N., Polloni A.E., Remonato D., Arbter F., Vardanega R., Cechet J. L., Di Luccio M., Oliveira D., Treichel H., Cansian R. L., Rigo E., Ninow J. L. Isolation and Screening of Lipase-Producing Fungi with Hydrolytic Activity, *Food Bioprocess Technology*. 2010.

Gupta M.N., Roy I.; Enzyme in organic media: Forms, functions and applications. *European Journal of Biochemistry*, 2004:v.271:2575-2583.

Gupta, M.N.; Enzyme function in organic solvents. *European Journal of Biochemistry*, 1992:203, 25-32.

Gupta S., Kapoor M., Sharma K.K., Nair L.M., Kuhad R.C.; Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach, *Bioresource. Technology*, 2008:99, 937–945.

Hasan F., Shah A.A., Hamee A.; Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006:39, 235-251.

Hasan F., Shah A.A., Hameed A; Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 2009:27, 762-768.

Holker U., Lenz J.; Solid-state fermentation are there any biotechnological advantages. *Current Opinion in Microbiology*, 2005:8, 301-306.

Holker U., Höfer M., Lenz J.; Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004:64: 175–186.

Jaeger K.E., Ransak S., Koch H.B., Ferrato F., Dijkstra B.W.; Bacterial lipase. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994:15, 29-63.

Jaeger K.E., Reetz M.T.; Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 1998:16, 396-403.

Jaeger K.E; Eggert T.; Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002:13, 390-397.

Juliano B. O., Bechtel, D. B.; The rice grain and its gross composition. In *Rice chemistry and technology*, St. Paul, Minnesota, USA: The American Association of Cereal Chemists, 1994, 17-57.

Kamini N.R., Mala J.G.S., Puvanakrishnan R.; Lipase production from *aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process biochemistry*, 1998: 33,505-511.

Kawakami K., Takahashi R., Shakeri M., Sakai S.; Application of a lipase-immobilized silica monolith bioreactor to the production of fatty acid methyl esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009: 57, 194–197.

Kemeny D.M., Challacombe S.J.; *Elisa and other solid phase immunoassays*. New York, John Wiley & Sons Ltda, 1988.

Kempka A.P., Lipke N.L., Pinheiro T.L.F., Menoncin S., Treichel H., Freire D.M.G., Di Luccio M., Oliveira D.; Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2008:31, 119-125.

Kiran G.S., Shanmughapriya S., Jayalakshmi J., Selvin J., Gandhimathi R., Sivaramakrishnan S., Arunkumar M., Thangavelu T., Natarajaseenivasan K.; Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2008:31, 83-492.

Krieger N., Taipa M.A., Melo E.H.M., Lima J.L., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S.; Purification of *Penicillium citrinum* lipase by chromatographic processes. *Bioprocess Engineering*, 2004:20, 59-65.

Lanara – Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus ingredientes. II-Métodos Físico e Químico – Ministérios da Agricultura – Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária – Laboratório Nacional de Referência Animal. Brasília, 1981.

Langone M.A., De Abreu M.E., Rezende M.J., Sant’Anna Jr. G.L.; Enzymatic synthesis of medium chain monoglycerides in a solvent-free system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002:100, 987-996.

Lima V.M.G., Krieger N., Mitchell D.A.; Fontana J.D.; Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochemical Engineering Journal*, 2004:18, 65-71.

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*, 2006:v.39:98-102.

Liu X.; Piao X.; Wang Y.; Zhu S.; He, H.; Calcium methoxide as a solid base catalyst for the transesterification of soybean oil to biodiesel with methanol, 2008:87, 1076-1082.

Liu Z, Chi Z, Wang L, Li J; Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical Engineering Journal*, 2008: 40, 445–451.

Magalhães T.O., Fernandes J. A., Corso T., Einloft S, Dullius J., Ligabue R.; Complexos de estanho como catalisadores na produção de biodiesel obtido a partir do óleo do farelo de arroz. 17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2006: Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

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*, 2002:38, 715-721.

Maldonado R.R., Burkert J.F.M., Maugeri F., Rodrigues M.I.; Estudo da produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 em frascos agitados utilizando meios industriais, in VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa, 2006:121.

Manuel F., Francisco J.P., Oscar M.N., Fuensanta R., Antonio B.; Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2000: 75, 569-576.

Martínez-Ruiz A., García H. S., Saucedo-Castañeda G., Favela-Torres, E.; Organic Phase Synthesis of Ethyl Oleate Using Lipases Produced by Solid-state Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008:151, 393-401.

Martins V.G., Kalil S.J., Costa J.V.; Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Química Nova*, 2008:31, 1942-1947.

Menoncin S., Domínguez N.M., Freire D.M.G., Toniazzi G., Cansian R.L., Oliveira J.V., Di Luccio M., Oliveira D., Treichel, H.; Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran, 2009: DOI 10.1007/s11947-008-0104-8.

Miranda O.A., Salgueiro A.A., Pimentel M.C.B., Filho J.L., Melo E.H.M., Durán N.; Lipase production by Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. *Bioresource Technology*, 1999:69, 145-147.

Mitchell, D.A., Von Meien, O.F., Krieger, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 2003:13, 37-147.

Montesinos J.L., Obradors N., Gordillo M.A., Valero F.S.; Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1996:59, 25-37.

Orive G., Ponce R.M., Hernández A.R., Gascón M., Pedraz I.J.L.; Biocompatibility of microcapsules for cells immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials*, 2002:23, 3825-3831.

Padilha G S., Ferreira J F., Castiglioni G. L., Monte Alegre R., Tambourgi E. B.; Avaliação da lipase extracelular de *Pseudomonas cepacia* para purificação em sistema bifásico aquoso. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2011:31:1, [http:// www.scielo.br](http://www.scielo.br)

Palma M., Pinto A.L., Gombert A.K., Seitz K.H., Kivatiniz S.C., Castilho L.R., Freire D.M.G.; Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid water of industrial babassu

oil production as substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2000:84-86, 1137-1145.

Pandey A. Soccol C.R., Nigam P., Soccol V. T.; Biotechnological potential agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 2000:74, 69-80.

Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R., Nigam P.; Solid state fermentation for the production of industrial enzyme. *Current Science*, 1999:77, 149-162.

Pandey A., Soccol C.R.; Solid state fermentation: fundamentals and applications. Londres, Asiatec Publishers, 2001, 221p.

Pandey A.; Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 2003:13, 81-84.

Persson M., Mladenoska I., Wehtje E., Patrick Adlercreutz P.; Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002:31, 833–841.

Peter F. E, Preda G.; Characterization of pancreatic lipase substrate specificity in organic reaction media by kinetic method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002:19-20, 467-472.

Pimentel M.C, Krieger N, Coelho LC, Fontana JO, Melo EH, Ledingham WM, et al.; Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1994; 49, 59–74.

Pintado J., Torrado a. González M.P., Murado M.A.; Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid –state cultura of *Aspergillus niger* on polyurethane foams. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998:23, 149-156.

Pinto G. A. S., Brito E. S., Andrade A. M. R., Fraga S. L. P., Teixeira R. B., Pizarro A.V.L., Park E.Y.; Fermentação em estado solido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. *Comunicado Técnico Embrapa*, 2005:ISSN 1679-6535/1077-1082.

Qi W-T., Ma J., Yu W-T., Xie Y-B., Wang W., Ma X.; Behavior of microbial growth and metabolism in alginate-chitosan-alginate (ACA) microcapsuls. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, 2006:38, 697-704.

Rajendran A., Thangavelu V.; Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. *Food Science and Technology*, 2009:42, 985–992.

Rajendran A., Palanisamy A., Thangavelu V.(b); Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2009 :52: 1.

Ramachandran S., Patel A.K., Madhavan N.K., Francis F., Nagy V., Szakacs G., Pandey A.; Coconut oil cake-a potential raw material for the production of α -amylase. *Bioresource Technology*, 2004:93, 169-174.

Ramachandran S., Singh S.K., Larroche C., Soccol C.R., Pandey A.; Oil cakes and their biotechnological applications: A review. *Bioresource Technology*, 2007:98, 2000-2009.

Razak C.N.A., Salleh A.B., Musani R., Samad M.Y., Basri M.; Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil effluent. *Journal of Molecular Catalysis*, 1997:3, 153-159.

Rigo E., Ninow J. L., Di Luccio M., Oliveira, V., Polloni A. E., Remonato D., Arbter F., Vardanega R., Oliveira D., Treichel H.; Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *Food Science and Technology*, 2010:43, 1132-1137.

Rigo E., Ninow J. L., Polloni A. E., Remonato D., Arbter F., Vardanega R., Oliveira D., Treichel H., Di Luccio M.; Improved lipase biosynthesis by a newly isolated *Penicillium* sp. grown on agricultural wastes. *Industrial Biotechnology*, 2009:5, 1-5.

Risso F.V.; Síntese de oligossacarídeos em meio orgânico e aquoso utilizando-se inulinase livre e imobilizada produzida por *Kluveromyces marxianus* ATCC 16045 e NRRL Y-7571.

Campinas – SP: 2004. Tese de Doutorado Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade estadual de Campinas.

Rocha W. S., Grosso C.R.F.; Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose. *Sitientibus*, Feira de Santana, 2006:35,125-148.

Rodrigues M.I., Iemma A.F.; Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos, Uma estratégia sequencial de planejamentos, 2005, 325p.

Rodrigues M.S.M.; Produção de lipases e sua aplicação na eliminação de resinas em lignocelulósicos. Campinas:Tese de Doutorado Departamentto de Química Orgânica. Universidade Estadual de Campinas, 1997.

Rodrigues D. S., Cavalcante G. P., Silva G. F., Ferreira A. L. O., Gonçalves L. R. B.; Effect of additives on the esterification activity of immobilized *Candida antarctica* lipase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008:24, 833–839.

Rodriguez J.A., Mateos J.C., Nungaray J , Gonza´lez 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*, 2006:41, 2264–2269.

Saxena R.K., Sheoran A., Giri B., Davidson W.S. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiology Methodology*, 2003:52, 1-18.

Shamel M., amachandran K. B., Hasan M., Al-zuhair S.; Hydrolysis of palm and olive oils by immobilised lipase using hollow fibre reactor . *Biochemical Engineering Journal*, 2007:34, 228–235.

Sharma R, Chisti Y., Banerjee U.C.; Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 2001:19, 627-662.

Singhania R., Patel A. K., Soccol C. R., Pandey A. ,Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2009: 44, 13–18.

Shimada Y., Watanabe Y., Sugihara A., Tominaga Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of molecular Catalysis B: enzymatic*, 2002:17,133-142.

Silva M. F.; Produção e caracterização parcial de lipases de *penicillium verrucosum* e *penicillium brevicompactum* utilizando como substratos torta de babaçu e farelo de mamona. 2010. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil.

Silva M.F., Freire D.M.G., Castro A.M., Di Luccio M., Mazutti M.A., Oliveira J.V., Treichel H., Oliveira D. Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. *Bioprocess Biosyst Eng* , 2011^a: 34, 145–152.

Silva M.F., Freire D.M.G., Castro A.M., Di Luccio M., Mazutti M.A.,• Oliveira J.V., Treichel H., Oliveira, D. Concentration, partial characterization and immobilization of enzymatic extract from *P. brevicompactum* by solid state fermentation of babassu cake and castor bean cake. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011^b

Silva W.O.B., Miditieri S., Schrank A., Vainstein M.H.; Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, 2005: 40, 321-326.

Singhania R.R., Patel A. K., Soccol C. R., Pandey A.; Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 2009:44, 13–18.

Smaniotto A.; Produção e caracterização parcial de uma ‘lipase sintética’ produzida por uma nova cepa de *Sporobolomyces ruberrimus*. 2010. Dissertação de mestrado em Engenharia de

Alimentos, Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil.

Smits J.P., Rinzema A., Tramper J., Schlosser E.E., Knol W.; Accurate determination of process variables in a solid state fermentation system. *Process Biochemistry*, 1996;31, 669-678.

Soares C. M.; Castro H. F.; Moraes F. F.; Zanin G. M.; *Applied. Biochemistry and Biotechnology*, 1999;77, 745.

Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S.; Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, 2003;13, 205-218.

Sousa J. S., Cavalcanti-Oliveira E., Arandab D. A.G., Freire D.M.G.; Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, doi:10.1016.

Stocklein W., Sztajer H., Menge U., Schmidt R.D.; Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochimie and Biophysics Acta*, 1993;1168, 181-189.

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*, 2008;43, 219-224.

Sun S. Y., Xu Y.; Membrane-bound ‘synthetic lipase’ specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. *Bioresource Technology*, 2009;100, 1336–1342.

Takaç S., Marul B.; Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial and Microbial Biotechnology*, 2008;35, 1019-1025.

Teng Y., Xu Y., Wang D.; Changes in morphology of *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation and their effect on production of mycelium-bound lipase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2009:32, 397–405.

Treichel H, Oliveira D, Mazutti M A, Di Luccio M, Oliveira J. V.; A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, 2010:3, 182-196.

Ul-Haq I., Idrees S., Rajoka M.I.; Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 2002:37, 637-641.

Vardanega R., Remonatto D., Arbter F., Polloni P., Rigo E., Ninow J.L, Treichel H., Oliveira D., Di Luccio M.; A Systematic Study on Extraction of Lipase Obtained by Solid-State Fermentation of Soybean Meal by a Newly Isolated Strain of *Penicillium* sp. *Food and Bioprocess Technology*, 2010:3, 461–465.

Vargas G.D.L.P., Treichel H., Oliveira D., Beneti S.C., Freire D.M.G., Di Luccio M.; Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2008:83, 47-54.

Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J., Haas M.M.; Customizing Lipases for Biocatalysis: a Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000:9, 113-148.

Wang D., Xu Y., Tianyu S.; 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*, 2008:32-37.

Wolski E., Menusi E., Remonatto D., Vardanega R., Arbter F., Rigo E., Ninow J., Mazutti M., Di Luccio M., Oliveira D., Treichel H.; Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: A comparative study. *LWT – Food Science and Technology*, 2009:42, 1557-1560.

CAPÍTULO 7

7 ANEXO

Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* under solid state fermentation using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates

Running title: Lipases production using agroindustrial residues

Daniela dos Santos de Oliveira^a, Lenir Rigoli Ferraz^a, Catiane Michalski^a,
Marceli Fernandes Silva^a, Elisandra Rigo^a, Marco Di Luccio^a, J. Vladimir Oliveira^a,
Débora de Oliveira^a, Helen Treichel^{a*}

^aDepartamento de Engenharia de Alimentos, URI-Campus de Erechim,

Av. Sete de Setembro 1621, Erechim, RS 99700-000, Brazil

*helen@uricer.edu.br

Abstract

Current studies about lipases production involve the use of agroindustrial residues and newly isolated microorganisms aimed at increasing economic attractiveness. Lipases produced by a newly isolated *Sporidiobolus ruberrimus* strain have potential catalytic ability for esterification reactions. Lipase activities of about 130.1U/g, 164.2U/g and 189.5U/g were obtained using soybean meal, sugarcane bagasse and rice meal as substrates, respectively, at 30°C and 60% moisture content. The partial characterization of the crude extracts showed that the evaluated lipases presented, in general, more

specificity to short chain alcohols and fatty acids. The enzymatic extracts presented activation at 35°C, while at 60°C all extracts were inactivated after 72 hours of incubation. The extracts presented higher relative activities when stored at room temperature compared to the storage at 4 and -10°C. Lipases showed higher activities at memories of pH around neutrality (6.5) and about 40°C. The consecution of this work permits us to conclude that the yeast *Sporobolomyces pararoseus* is a promising microorganism for producing lipases with esterification activity using different agroindustrial residues as substrates. The use of agroindustrial residues as alternative sources of substrates for enzyme production can reduce considerably the costs of production and also contributes to reduce the environmental pollution.

Keywords: *Sporobolomyces ruberrimus*, sugarcane bagasse, soybean bran, rice bran, lipases.

Introduction

Lipases (E.C. 3.1.1.3) and esterases (E.C. 3.1.3.1) constitute an important group of enzymes associated to the metabolism and hydrolysis of lipids. This class of biocatalyst is found in animal and vegetal organisms and in microorganisms.¹ The ability to catalyze reaction in micro-aqueous ambient became these catalysts largely used to produce esters from fatty acids and alcohols.¹⁻³

One relevant limitation to industrial application of microbial lipases has been related to their production cost, which is determined by the production yield, experimental conditions of the process and enzyme stability.³ Therefore, it is interesting to develop strategies to enhance the process productivity by employing newly isolated high-enzyme producer microorganisms as well as to optimize the conditions of cultivation through manipulation of the main variables that affect the process. Besides, the application of lipases in large-scale industrial processes requires careful investigation of potential techniques suitable for the reuse and increase the enzyme stability, such as concentration/purification and immobilization strategies. The use of agroindustrial residues as raw materials can contribute to reduce the total production cost of this enzymes.¹

Additionally, lipases should be selected for each industrial application based on their substrate specificity and with regard to stability to pH and temperature.⁴ The catalytic properties of lipases,

such as selectivity and stereospecificity can be changed through manipulation of reaction conditions. The influence of the medium composition on lipases properties is associated to a complex mechanism of enzymes action, which can involve conformational changes in their structures.⁵

Taking into account the above presented statements, this work is aimed at optimizing lipases production with esterification activities, by solid state fermentation (SSF) using *Sporobolomyces ruberrimus* and three agroindustrial residues as substrates, soybean meal (SM), rice meal (RM) and sugarcane bagasse (SB). Additionally, the partial characterization of the crude enzymatic extracts was also carried out in terms of stability to low and high temperatures, memories of pH and specificity to several alcohols and fatty acids.

Material and Methods

Substrates

The raw materials used for lipases production by SSF were soybean meal (kindly donated by OLFAR, Erechim, RS, Brazil), rice meal (a gift from Josapar, Pelotas, RS, Brazil) and sugarcane bagasse (donated by a local distillery). All materials were stored at -15°C and used without further treatment.

The substrates were characterized in terms of protein, lipids, moisture and mineral contents. The protein content was determined by Kjeldhal method, the lipid concentration by organic solvent extraction and the moisture content by the method of desiccation in oven with air circulation at 105°C. Total minerals (ashes), determined by incineration in oven at 550°C, were solubilized in 1M nitric acid and the macronutrients (Mg, Ca, Na, K) and micronutrients (Mn, Fe, Zn, Cu.) contents were determined by flame absorption atomic spectrometry-FAAS (Varian Spectra AA-55). All the methodologies employed followed the standards established by AOAC⁶ and AOCS.⁷

Microorganism and cell production

The yeast used in the present study was previously isolated from soybean meal and identified as *Sporidiobolus pararoseus*.⁸ This microorganism was maintained in glycerol at -80°C and potato

dextrose agar slants under refrigeration. The propagation was carried out for 3 days at 30°C in Petri plates containing a medium constituted by potato dextrose agar (PDA) 3.9wt% and distilled water. The pre-inoculum was prepared by adding the microorganism from the plate in test tubes containing 10mL of PC medium (0.5, 0.25 and 0.1 wt% of triptone, yeast extract and dextrose, respectively) sterilized at 121°C for 15min. The mixture was incubated at 30°C for 24h. The inoculum was prepared by mixing the pre-inoculum with 90mL of sterilized PC media in 250mL Erlenmeyer flasks covered with cotton plugs. Flasks were incubated in orbital shaker at 30°C and 150rpm for 24 hours.

Solid state fermentation

The experiments were carried out aseptically in conical reactors (volume of approximately 600mL) covered with hydrophobic fabric. The substrate (about 10g of dry matter) was sterilized at 121°C for 20min. The moisture content of the media was adjusted according to the experimental design. Cultivation was carried out in an incubator with humidified air injection at a fixed temperature of 30°C.

After the fermentation time, phosphate buffer (100mM, pH 7.0) at a proportion of 1:4(v/w) was added to the fermented cake and the enzyme extraction was carried out in an orbital shaker at 150rpm, 35°C for 30min. After filtration of solids, the supernatant was lyophilized (Edwards, model E2M8) for 48 hours up to constant weight, defined as crude enzymatic extract and used for analytical assays.⁹ All experimental conditions were determined in previous works.¹⁰⁻¹²

Determination of esterification activity

The esterification activity of the lyophilized crude enzymatic extract was quantified by the synthesis reaction of oleic acid and ethanol (molar ratio 1:1).¹³ The reaction was carried out at 40°C, 160rpm and 40min. Firstly, 0.1g of the crude extract was added to the substrates, and kept by the pre-determined reaction time in an orbital shaker. Aliquots of 500μL were withdrawn from the reactional medium at the beginning and the end of the reaction. To each sample 20mL of acetone-ethanol

solution (1:1) (v/v) was added. The amount of acid consumed was determined by titration method using NaOH 0.035mol/L.

Evaluation of lipases production

Preliminary tests

The substrates, without previous treatment, were used in SSF, following the methodology described before. The moisture content was adjusted to 55% and 27°C,¹¹ taking into account the original moisture of each substrate. The lipase activity of lyophilized extracts was measured at 24, 48, 72, 96 and 120 hours of fermentation. Each experimental run was carried out in duplicate so that results reported represent in fact mean values.

Optimization of lipases production

Following the results obtained in the preliminary tests, the optimization of lipase production by *S. ruberrimus* was carried out for 48 hours for soybean meal and rice meal as substrates and 72 hours for sugarcane bagasse. Experimental designs were carried out for each substrate tested in this work. The effects of moisture content (50, 60 and 70%) and temperature (20, 30 and 40°C) were evaluated on enzyme activity of the lipases produced by SSF. All experiments were carried out in duplicate.

Partial characterization of crude enzymatic extracts

Alcohol specificity of the crude enzymatic extracts

The lyophilized crude enzymatic extracts obtained from each substrate were tested as catalysts in synthesis reactions using oleic acid and different alcohols as substrates. Methanol, ethanol, n-propanol and 1-butanol at fatty acid to alcohol molar ratio of 1:2 were used in this step.

Acid specificity of the crude enzymatic extracts

The lyophilized crude enzymatic extracts obtained from each substrate were also tested as catalysts in synthesis reactions using n-propanol and different fatty acids (oleic, butyric and lauric) at molar ratio of 1:2, as substrates.

7.1.1 *Stability to high temperatures*

The stability of enzymatic extracts to high temperatures was performed by incubation of the lyophilized crude enzymatic extracts at 30, 45 and 60°C. The esterification activity was monitored until the total loss of activity each 24h.

Stability to room and low temperatures

The stability of lyophilized crude enzymatic extracts to low temperatures was carried out by storage at 4, -10°C and room temperature by measurement the esterification activities each 10 days of storage.

Effect of temperature and memories of pH on lipase activity

Aiming at evaluating the effect of memory of pH and temperature, the crude enzymes obtained from each substrate were incubated in different buffers (pH varying from 3.0 to 10.0) for 20min at 4°C and lyophilized, according to the methodology proposed by Sun & Xu.³ The esterification activity was measured at different temperatures (11.8 - 68.2°C) following the methodology described above.

These ranges of pH and temperature were evaluated according to the experimental design methodology. A composite central rotatable design (DCCR) 2² was performed for each extract supra-cited.

Statistical analysis

The statistical analysis related to the estimated effects of each variable and process optimization was performed using the global error. It may be important to mention that the results related to the enzymatic extract characterization are in fact mean values of triplicate runs, which

resulted in an overall absolute deviation of reaction conversion of around 5 %. All analysis was performed using the software Statistica version 6.0 (Statsoft Inc, USA).¹⁴

Results and Discussion

Substrates characterization

Table 1 presents the characterization of soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse, used as raw materials in this work. A preliminary inspection of this table permits us to consider all agroindustrial residues as good substrates for fermentation processes. The substrates present significant differences in terms of contents of ash, moisture, protein, nitrogen, lipids and minerals. The rice meal showed higher concentration of carbon and soybean meal higher concentration of nitrogen and proteins. Lower contents of ashes and minerals were obtained for sugarcane bagasse. Both rice and soybean meals presented pH near to the neutrality. The sugarcane bagasse showed an acid value of pH. The moisture content obtained for each substrate was taken into account for adjusting the moisture of fermentation media.

The contents of nitrogen in soybean meal and lipids in rice meal obtained here can be considered higher than those found for babassu meal and castor cake, characterized previously by Silva et al.⁵ The same authors evaluated the pH values of these substrates, and found 7.0 to 8.0 for castor cake and from 6.5 to 7.5 for babassu cake.

The production of lipases can be induced by different lipid substrates, but the mechanism involved is still under investigation.¹⁵ Literature points out that the medium supplementation by lipids is sometimes efficient. In other cases, the addition of supplementary sources of carbon can reduce the enzyme production due to the catabolic repression by the carbon present in culture medium.¹⁶ Based on these aspects, in this work we have carried out a systematic study for each agroindustrial residue used as substrate, without supplementation, to investigate the potential of these residues to produce lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* as an alternative to reduce production costs.

Evaluation of lipases production

Preliminary tests

Previously to the step of optimization of lipases production, a kinetic assay was performed using each different substrate. The microorganism was inoculated in soybean meal, following the optimized conditions established by Vargas et al.¹¹ Figure 1 presents the kinetic curves for esterification activity in sugarcane bagasse, rice meal and soybean meal along 120 hours of fermentation. From this figure it is possible to verify that high esterification activities were achieved: 116.4U/g (72h), 128.9U/g (48h) and 269.4U/g (48h) for sugarcane bagasse, rice meal and soybean meal, respectively.

Compared to the other substrates, the use of sugarcane bagasse as substrate needs higher fermentation time (72h) to reach the maximum esterification activity. This can be related to the substrates composition, since the sugarcane bagasse is poorer than rice and soybean meals. Fermentation time was fixed in the experimental design at 48h for rice and soybean meals and 72h for sugarcane bagasse.

Based on the results obtained until now it seems that the tested substrates do not need supplementation as carbon and nitrogen sources, since promising results in terms of lipase esterification activity were obtained in the preliminary test.

Optimization of lipases production

Table 2 presents the real and coded values for independent variables (moisture content and temperature) and the responses in terms of esterification activity for each substrate. From this figure one can observe that higher enzyme activity (143.5U/g for soybean meal) was obtained in experiment 7 of the experimental design, followed by that of the central point (125.8, 130.1 and 134.5U/g). The use of sugarcane bagasse as substrate led to esterification activities of 163.8, 169.3 and 159.5U/g for the experiments at the central point. The best response for lipase produced from rice meal was obtained in experiment 1 of the experimental design (202.5U/g). Similar activities (189.5, 191.1 and 189.0U/g) were also obtained in experiments 9, 10 and 11 of the experimental design, respectively. On the other hand, lower esterification activities were obtained from experiment 8, moisture content

of 60% and temperature of 44°C, for all substrates, probably due to the high temperature employed in this experiment. In this case, it seems that the microorganism tends to produce higher enzyme contents in intermediate levels of moisture and temperature. This fact can be attributed to heat and mass transfer limitations found at higher moisture levels. The effect of temperature can be related to the decay in the moisture content provoked by high temperatures. As already observed by other authors, extremes values of temperature and moisture reduce the lipases production.¹⁶

The statistical analysis of the experimental data reported in Table 2 permitted the validation of empirical models for esterification activity as a function of temperature and moisture content for each fermentation time evaluated. Equations 1, 2 and 3 present the coded optimized models for the system containing soybean meal (48 hours of fermentation), rice meal (48 hours of fermentation) and sugarcane bagasse (72 hours of fermentation), respectively. The models were validated by variance analysis (ANOVA) with correlation coefficients of 0.92, 0.91 and 0.94 and F-test (calculated value 2.2, 2.0 and 3.4 higher than the tabled ones, respectively), making the models valid at 95% of confidence. Figure 2 (a, b and c) presents the response surface for the validated models for soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrate.

$$EASM = 130.22 + 12.69 M(L) - 22.29 M^2 - 43.32 T(L) - 34.92 T^2 + 3.11 M(L) * T(L) \quad (1)$$

$$EARM = 189.39 - 26.22 M(L) - 19.24 M^2 - 24.91 T(L) - 55.38 T^2 + 22.91 M(L) * T(L) \quad (2)$$

$$EASB = 164.12 - 15.74 M(L) - 31.69 M^2 - 36.8 T(L) - 51.59 T^2 + 7.74 M(L) * T(L) \quad (3)$$

where EASM denotes the esterification activity at 48 hours of fermentation and soybean meal, EARM is the esterification activity at 48 hours of fermentation and rice meal, EASB is the esterification activity at 72 hours of fermentation and sugarcane bagasse, T is temperature and M is the moisture content.

From Figure 2 one can see that the maximum lipase esterification activity was found around the central point of the experimental design (temperature of 30°C and moisture content of 60%). Extreme values of moisture content and temperature tend to reduce lipase production. Low moisture

content can difficult the transport of nutrients and toxins through the membrane and can also cause the lost of functional properties of metabolic chain.¹⁷ An excess of moisture reduces the substrate porosity, hindering the heat and oxygen transfer.¹⁸⁻²¹

The temperature and substrates composition (carbon, nitrogen and minerals contents and pH) should also be taken into account, as these parameters can activate or inhibit the enzyme production. So, it is worth to mention that the lipases production is directly related to the total area of the substrate and the ideal range of pH is associated with the activation of the active site of hydrolases.²² The lipases production can be influenced by the carbon content when this is of lipid origin.²¹ Some works relates that the medium supplementation is not efficient.¹⁶ Kiran et al. showed that the supplementation with 1% of tributirin led to maximum lipase production by *Pseudomonas* sp. However, the addition of other carbon sources led to a reduction in enzyme production, a fact attributed to the catabolic repression by carbon source in the culture medium.²³

Related to the moisture content, studies on lipase production by SSF indicate needs of 70% of moisture in inert support (Avincel)²⁴ using babassu cake^{18,25-26} and soybean meal¹⁰ as substrates. The SSF of sugarcane bagasse conducted to good productivity results at moisture content of 75%.²⁷ Godoy et al. verified that the productivity enhances at high values of a_w , and after 48 hours of fermentation the reduction in a_w values led to lower lipase activities.²⁸

The establishment of optima conditions for production of microbial lipases is of extreme importance from an industrial point of view, and in this case the intermediate values for moisture content and temperature defined as optima can be economically interesting.

Partial characterization of crude enzymatic extracts

The crude enzymatic extracts obtained from each substrate were partially characterized in terms of stability to low and high temperatures, specificity to different substrates of esterification (alcohols and fatty acids) and optimum temperature and memory of pH.

Specificity to esterification substrates

The esterification activity of the crude extracts using butyric and oleic acids as substrates and different alcohols (methanol, ethanol, 1-propanol and 1-butanol) is presented in Figure 3 (a) and (b), respectively. One can see that, in general, the use of butyric acid as acyl donator affords higher esterification activities when methanol was used as substrate. This extract was obtained from soybean meal. For the same extract, the use of ethanol and butyric acid as substrates led to the second higher activity (362.2U/g). The extract obtained from sugarcane bagasse and rice meal also presented higher activities (327.0 and 296.4U/g, respectively) when butyric acid and ethanol were used as esterification substrates.

A tendency of higher specificity was also observed for methanol and ethanol when oleic acid was used as substrate (130.8 and 126.5U/g, respectively for extracts from soybean meal and rice meal). Lauric acid was also tested as acyl donator but the enzyme extracts, in general, did not present significant activities. We did not observe activities for enzymes produced by rice meal and sugarcane bagasse as substrates for all tested alcohols. This fact can be associated to the higher specificity of crude enzymatic extracts for fatty acids of long chain unsaturated (oleic acid) compared to saturated (lauric acid) one.

Data presented in Figure 3 showed that, in general, the crude extracts presented higher specificity to short chain fatty acids (butyric acid) and alcohols with low carbon chain (methanol and ethanol).

The specificity to short chain fatty acids is in agreement with the observation of Peter & Preda,²⁹ when they evaluated a pancreatic lipase. The enzyme extracted by these authors presented specificity to valeric and butyric acids and a lower esterification activity using longer chain acids. Abbas & Comeau evaluated the specificity of an immobilized lipase from *Mucor* sp. to short chain fatty acids (propionic, butyric and caproic).² These acids were previously cited in the literature as inhibitors of the catalytic properties of the lipases, however, all of them were able to catalyze esterification reaction using different alcohols. It is important to mention that higher yields were observed using long chain fatty acids.

Other works available in the literature that evaluated the lipases specificity to fatty acids with different chains cite that this group of enzymes commonly presents higher specificity to fatty acids with 8 to 16 carbons. Some examples are the works by Sun & Xu³ using synthetic lipases and Langrand et al.³⁰ and Wang et al.¹⁵ using esters hydrolytic lipases.

Related to the specificity to different alcohols, the lipase evaluated by Abbas & Comeau presented a particular affinity to short chains alcohols as methanol, ethanol, 2-propen-1-ol and 1-butanol.² These results are in disagreement with the works by Langrand et al.³⁰ and Sun & Xu,³ where the yields decreased with the increase of the number of carbon atoms. According to Ghandi et al.³¹ and Abbas & Comeau,² differences in lipase affinities to different alcohols can be explained in terms of the link energy that is liberated when the substrate binds to the active site.

Results presented in this work showed that the enzymatic extracts are able to catalyze esterification reactions between alcohols and fatty acids with short chains. The reaction product can be applied as flavors in the industries. Ethyl esters synthesized from acids are an important group of flavor and fragrances widely employed in food and beverage industries.³¹ These esters are usually obtained by chemical reactions and the market value is lower than the ones obtained by natural paths. Few works can be found in the literature showing the affinity of non-commercial lipases to short-chain substrates, since these compounds can cause inhibitory effects.^{2,32} So, the use of the enzymes for flavors production could be considered an interesting application.

Stability to high temperatures

The thermal stability of the crude enzymatic lyophilized extracts produced by the yeast *Sporobolomyces ruberrimus* using different substrates at 35, 45 and 60°C was monitored in terms of esterification activity for 168 hours, each 24 hours. The relative enzyme activity was associated to the initial activity. Figure 4 (a, b and c) presents this parameter along the incubation time at 35, 45 and 60°C, respectively.

From this figure one can observe that the enzymatic extracts from rice meal and sugarcane bagasse presented a little activation at 35°C. The extract from sugarcane bagasse presented a peak of

activity and high stability, keeping its activity until 144 hours of incubation. Other two extracts were completely deactivated after 120 hours of incubation. The extract obtained using rice meal as substrate kept 47.8% of its initial activity after 96 hours of incubation and 35°C, showing higher stability up to this period of time compared to the extracts from soybean meal and sugarcane bagasse.

The activation of lipases at 30°C was observed by Fernandes et al.³³ studying hydrolysis reactions catalyzed by lipases from *Thermomyces lanuginosa*. Casa et al.³⁴ evaluated the thermal stability of crude lipases in organic solvent at 30°C and obtained a half-life time of about 6 days.

Figure 4(b) presents the relative enzyme activity for incubation at 45°C. The enzymatic extracts produced did not show thermal activation at this temperature. The extract obtained from sugarcane bagasse kept 55.1% of its initial activity at 48 hours of incubation, followed by the extracts from rice meal and soybean meal, which kept 48.2 and 45.5% of their initial activities after this period of time, respectively. All enzyme extracts suffered complete deactivation after 96 hours of incubation.

At 60°C, all extracts presented thermal deactivation. The extracts from rice meal and sugarcane bagasse showed complete deactivation after 72 hours of incubation.

Cao et al. studied the stability of a synthetic lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized in silica at 60°C.³⁵ An increase of about 40% in the enzyme activity was observed after 1 hour of incubation. After 12 hours of incubation, 50% of activity reduction occurred. Fernandes et al., at higher temperatures (37, 50 and 60°C), showed that the enzyme lost its activity in short times, keeping only 40% of the initial activity after 30 minutes of incubation.³³ Smaniotto evaluated the thermal stability of enzymatic extracts obtained from synthetic and industrial media by submerged fermentation of the same yeast tested in this work.³⁶ Crude extracts presented a little thermal activation after incubation at 45°C. At 60°C, similar results were observed. The thermal stability of an enzyme is related to its structure and several ambient factors, since the presence of water can reduce the thermostability.³⁷

Stability to room and low temperatures

The stability of all lyophilized enzymatic extracts was evaluated keeping them at 4, and -10°C and room temperature by measurement the esterification activities each 10 days until 60 days of storage. Figure 5 (a, b and c) presents the profile of relative enzymatic activity (%) along the storage period.

From this figure it is possible to verify that the extract from sugarcane bagasse presented relative activity higher than 100% after 40 days of storage at 4°C and the extracts from soybean meal and rice meal relative activities lower than 50% after the same period (Figure 5a). From Figure 5(b) one can see that the enzymatic extracts stored at -10°C presented higher stability compared to those kept at 4°C. The enzymatic extract from sugarcane bagasse presented higher stability, keeping its activity higher than 50% and presenting a little activation after 60 days. This activation may be related to the potential that some enzymes have of regeneration.³⁸ The storage of enzymatic extracts at room temperature, presented in Figure 5(c), shows a tendency of better keeping the activities at this condition, for both enzymes produced by SSF and *Sporobolomyces ruberrimus* in all tested agroindustrial residues as substrates. This figure also shows that the extracts presented a peak of activity after 20 days of incubation.

In a general way, results obtained here are in agreement to those from Menoncin et al.³⁸ The study of these authors showed that a concentrated lipase extract kept its activity until 90 days of storage at the same temperatures (4 and -10°C) of the ones evaluated in the present work. Results obtained here demonstrate the advantage of keeping the enzymatic extracts at room temperature and the increase observed in the stability can be considered a promising result in terms of future application of these extracts.

Effect of temperature and memory of pH on lipase activity

According to Sun & Xu,³ the lyophilized enzymes presents a memory of pH, that is, the esterification activity in organic solvents is extremely dependent on the aqueous solution before

lyophilization. The memory of pH probably occurs because the ionic fixation of the catalytic proteic groups after drying of enzyme keep the same state in non-aqueous media.

To evaluate the behavior of the extracts at different temperatures and memories of pH, a Central Composite Rotatable Design (CCRD) 2^2 was carried out for each extract. Table 3 presents the matrix of the experimental design and the respective responses in terms of esterification activity for each extract.

One can see that higher activity values were obtained for the extract produced by sugarcane bagasse (mean of 146.3U/g lyophilized extract), at a memory of pH of 6.5 and 40°C. Higher activity values for the extracts from soybean meal and rice meal were also obtained at the central point of the experimental design, presenting mean values of 134.8 and 114.0U/g, respectively, showing that the enzymes presented higher activities at pH near the neutrality and near ambient temperatures. In the extreme values of temperature (11.8 and 68.2°C) low values of enzymatic activities were obtained. The same behavior was observed in alkaline (9.0 and 10.0) and acid (3.0 and 4.0) pH values.

Results presented in Table 3 were statistically treated and Equations 4 and 5 present the empirical models obtained for the enzymatic extracts from soybean meal and rice meal, respectively. Both models were validated ($F_{\text{calculated}} > F_{\text{listed}}$) by analysis of variance at 95% of confidence level. The determination coefficients were of 84% for both models.

$$EASM = 134.68 - 4.07 \text{ pH (L)} - 50.83 \text{ pH}^2 - 13.67 \text{ T (L)} - 61.71 \text{ T}^2 + 16.56 \text{ pH (L)} * \text{ T (L)} \quad (4)$$

$$EARM = 113.90 + 7.49 \text{ pH (L)} - 27.65 \text{ pH}^2 - 24.84 \text{ T (L)} - 41.82 \text{ T}^2 + 13.41 \text{ pH (L)} * \text{ T (L)} \quad (5)$$

where EASM is the esterification activity for soybean meal, EARM is the esterification activity for rice meal, T is temperature and pH is the pH values.

The responses surfaces obtained from each model (data not shown) permitted to observe that both extracts presented higher activities at mild temperature (about 40°C) and memories of pH near to the neutrality.

Gutarra et al. studied the characterization of a crude lipase obtained by SSF of babassu cake from *Penicillium simplicissimum*. These authors evaluated the optimal levels of temperature and pH for hydrolytic activity using a CCRD and pH values from 4 to 6 and temperatures from 45 to 50°C were the ranges that presented higher lipase activities.³⁹

Similar results were also obtained by Sun & Xu³. The lipase extracts produced by these authors showed maxima activities in memories of pH near to the neutrality (5.5 to 7.5). Memories of pH in alkaline (above 8.0) and acid (below 6.0) pH values resulted in complete loss of activity. The authors suggested that the loss of activity can be due to the alteration in ionization state of amino groups in the lyophilized proteins. The evaluation of effect of temperature on enzyme activities was also presented by these authors. Higher activities were achieved from 30 to 40°C.

Smaniotto evaluated the effect of temperature and memories of pH in lipase extracts obtained from *Sporobolomyces ruberrimus* and observed similar results to those found in the present study.³⁶

The evaluation of the effect of temperature and memory of pH constitutes an important step of this work since just a few works on this subject are presented in the literature and this information is relevant for proposing industrial applications of the enzymatic extracts obtained here.

Conclusions

The consecution of this work permits us to conclude that the yeast *Sporobolomyces pararoseus* is a promising microorganism for producing lipases with esterification activity using different agroindustrial residues as substrates. Lipase activities of about 130.1U/g, 164.2U/g and 189.5U/g were obtained using soybean meal, sugarcane bagasse and rice meal as substrates, without supplementation, respectively, at 30°C and 60% of moisture content. The partial characterization of the enzymatic extracts obtained showed that the evaluated enzymatic extracts presented, in general, more specificity to short chain alcohols and fatty acids. The enzymatic extracts presented a good thermal stability, showing activation at 35°C and at 60°C all enzymatic extracts presented thermal inactivation after 72 hours of incubation. The extracts presented higher relative activities when stored at room temperature compared to the storage at 4 and -10°C. The extracts showed higher activities at

memories of pH around neutrality (6.5) and near ambient temperature (about 40°C). The use of agroindustrial residues as alternative sources of substrates for enzyme production can reduce considerably the costs of production and also contributes to reduce the environmental pollution.

Acknowledgement

The authors thank CNPq and CAPES for the financial support and scholarships.

References

1. Treichel H, Oliveira D, Mazutti MA, Di Luccio M and Oliveira JV. A review on microbial lipases production. *Food Bioproc Technol* 3:182-196 (2010).
2. Abbas H and Comeau L, Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. *Enz Microb Technol* 32:589-595 (2003).
3. Sun SY and Xu Y, Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. *Bioresour Technol* 100:1336–1342 (2009).
4. Carvalho PO, Campos PRB, Noffs MA, Oliveira JG, Shimizu MT and Silva DM, Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova* 26:75-80 (2003).
5. Silva D, Tokuioshi K, Martins ES, Silva R and Gomes E, Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochem* 40:2885-2889 (2005).
6. AOAC. Official Methods of Analysis. 17th Ed. Association of Official Analytical 15 Chemists. Washington. DC (2000).
7. AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS Press. Champaign (2003).

8. Griebeler N, Polloni AE, Remonato D, Arbter F, Vardanega R, Cechet JL, Di Luccio M, Oliveira D, Treichel H, Cansian RL, Rigo E and Ninow JL, Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. *Food Bioproc Technol* DOI 10.1007/s11947-008-0176-5, in press (2010).
9. Persson M, Mladenoska I, Wehtje E and Adlercreutz P, Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enz Microb Technol* 31:833–841 (2002).
10. Di Luccio M, Capra F, Ribeiro NP, Vargas GDLP, Freire DMG and Oliveira D, Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *Appl Biochem Biotechnol* 113-116:173-180 (2004).
11. Vargas GDLP, Treichel H, Oliveira D, Beneti SC, Freire DMG and Di Luccio M, Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *J Chem Technol Biotechnol* 83:47-54 (2008).
12. Kempka AP, Lipke NR, Pinheiro TLF, Menoncin S, Treichel H, Freire DMG, Di Luccio M and Oliveira D, Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioproc Biosys Eng* 31:119–125 (2008).
13. Bernardes OL, Bevilaqua JV, Leal MCMR, Freire DMG and Lagnone MAP, Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. *Appl Biochem Biotechnol* 136-140:105-114 (2007).
14. Bas D and Boyaci I, Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. *J Food Eng* 78:836-845 (2007).
15. Wang D, Xu Y and Tianyu S, 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. *Biochem Eng J* 41:30-37 (2008).
16. Kamini NR, Mala JGS and Puvanakrishnan R, Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochem* 33:505-511(1998).

17. Gervais P, Molin P, The role of water in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 13:85-101 (2003).
18. Gutarra MLE, Cavalcanti EDC, Castilho LR and Freire DMG, Lipase production by solid-state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 121-124:105-116 (2005).
19. Pandey A, Solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 13:81-84 (2003).
20. Mitchell DA, Von Meien OF and Krieger N, Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochem Eng J* 13:137-147 (2003).
21. Mahadik ND, Puntambekar US, Bastawde KB, Khire JM and Gokhale DV, Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochem* 38:715-721 (2002).
22. Fojan P, Jonson PH, Petersen MTN and Petersen SB, What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie* 82:1033-1041 (2006).
23. Kiran GS, Shanmughapriya S, Jayalakshmi J, Selvin J, Gandhimathi R, Sivaramakrishnan S, Arunkumar M, Thangavelu T and Natarajaseenivasan K, Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). *Bioproc Biosys Eng* 31:83-492 (2008).
24. Chinn MS, Nokes SE and Strobel HJ, Influence of process conditions on end product formation from *Clostridium thermocellum* 27405 in solid substrate cultivation on paper pulp sludge. *Bioresour Technol* 98:2184–2193 (2007).
25. Azeredo LAI, Gomes PM, Sant'Anna JrG, Castilho LR and Freire DMG, Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. *Current Microbiol* 54:361-365 (2007).
26. Palma MB, Pinto AL, Gombert AK, Seitz KH, Kivatinitz SC, Castilho LR, Freire DMG, Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Appl Biochem Biotechnol* 84-86:1137-1145 (2000).

27. Rodriguez JA, Mateos JC, Nungaray J, González-Bhagnagar VT, Roussos S, Cordova J and Baratti J, Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochem* 41:2264–2269 (2006).
28. Godoy MG, Gutarra MLE, Maciel FM, Felix SP, Bevilaqua JB, Machado OLT and Freire DMG, Use of a low-cost methodology for biodegradation of castor bean waste and lipase production. *Enz Microb Technol* 44:317-322 (2009).
29. Peter F and Preda G, Characterization of pancreatic lipase substrate specificity in organic reaction media by kinetic method. *J Mol Catal B Enz* 19-20:467-472 (2002).
30. Langrand G, Triantaphylides C and Baratti J, Lipase-catalyzed formation of flavor esters. *Biotechnol Lett* 10:549-554 (1988).
31. Ghandi N, Sawant SB and Joshi JB, Specificity of a lipase in ester synthesis: effect of alcohol. *Biotechnol Prog* 11:282-287 (1995).
32. Ozyilmaz G and Ezer G, Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. *J Mol Catal B Enz* 64:140-145 (2010).
33. Fernandes MLM, Krieger N, Baron AM, Zamora PP, Ramos LPE and Mitchell DA, Hydrolysis and synthesis reactions catalyzed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. *J Mol Catal B Enz* 30:43-49 (2004).
34. Casa RM, Sinisterra JVE and Sánchez-Montero JM, Characterization and catalytic properties of a new crude lipase from *C. rugosa*. *Enz Microb Technol* 38:599-609 (2006).
35. Cao X, Yang J, Shu L, Yu B and Yan Y, Improving esterification activity of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in silica by bioimprinting with substrate analogues. *Process Biochem* 44:177-182 (2009).
36. Smaniotto A, Produção e caracterização parcial de uma ‘lipase sintética’ produzida por uma nova cepa de *Sporobolomyces ruberrimus*. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil (in portuguese) (2010).

37. Sharma R, Chisti Y and Banerjee UC, Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* 19:627-662 (2002).
38. Menoncin S, Domíngues NM, Freire DMG, Toniazzi G, Cansian RL, Oliveira JV, Di Luccio M, Oliveira D and Treichel H, Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran. *Food Bioproc Technol* 3:461-465(2010).
39. Gutarra MLE, Godoy MG, Maugeri F, Rodrigues MI, Freire DMG and Castilho L, Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bioresour Technol* 100:5249-5254 (2009).

Table 1. Chemical characterization of the substrates used for lipases production by SSF.

Substrate	Moisture	Ash	Lipid	Nitrogen	Protein	Minerals (mg/100g)					pH
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	Fe	K	Mg	Ca	Al	
Sugarcane	7.74	1.92	0.63	0.38	2.37	18.55	304.50	64.78	46.93	11.15	4.37
bagasse	±0.06	±0.04	±0.03	±0.01	±0.04	±1.57	±3.89	±1.39	±2.32	±0.50	±0.06
Rice	11.80	9.10	16.43	2.07	12.06	6.19	2014.93	1074.14	56.99	4.35	6.94
meal	±0.23	±0.02	±0.81	±0.03	±0.21	±0.19	±2.82	±3.95	±0.87	±0.43	±0.01
Soybean	13.62	5.60	8.5*	6.8*	42.5*	66.35	344.50	951.00	-	23.70	6.70
meal	±0.38	±0.05				±3.72	±3.46	±1.73		±0.08	±0.01

* Vargas et al. (2008).

Table 2. Matrix of the experimental design (coded and real values) and the response in terms of lipase activity for each substrate at 48 hours of fermentation for soybean meal (SM) and rice meal (RM) and 72 hours of sugarcane bagasse (SB).

Run	Moisture (%)	Temperature (°C)	Lipase activity (U/g)		
			SM	SB	RM
1	-1 (50)	-1 (20)	97.2	150.5	202.5
2	+1 (70)	-1 (20)	98.7	119.1	109.1
3	- 1 (50)	+1 (40)	19.3	43.7	111.9
4	+1 (70)	+1 (40)	33.3	43.3	110.3
5	-1.41(46)	0(30)	66.5	119.5	172.8
6	+1.41(74)	0(30)	127.3	56.4	91.9
7	0(60)	-1.41(16)	143.5	60.4	99.3
8	0(60)	+1.41(44)	0	13.1	21.7
9	0(60)	0(30)	125.8	163.8	189.5
10	0(60)	0(30)	130.1	169.3	191.1
11	0(60)	0(30)	134.5	159.5	187.9

Table 3. Matrix of the experimental design (coded and real values) and the response in terms of lipase activity for evaluation of temperature and memory of pH.

Run	pH	Temperature (°C)	Lipase activity (U/g)		
			SM	RM	SB
1	-1 (4.0)	-1 (20)	101.3	102.2	124.4
2	+1 (9.0)	-1 (20)	21.4	89.7	123.9
3	-1 (4.0)	+1 (60)	13.6	0	0
4	+1 (9.0)	+1 (60)	0	41.2	0
5	-1.41 (3.0)	0 (40)	0	33.9	56.5
6	1.41 (10.0)	0 (40)	43.2	56.0	74.7
7	0 (6.5)	-1.41 (11.8)	0	33.6	0
8	0 (6.5)	1.41 (68.2)	0	0	9.3
9	0 (6.5)	0 (40)	132.7	107.3	166.0
10	0 (6.5)	0 (40)	143.2	106.3	139.6
11	0 (6.5)	0 (40)	128.4	128.4	133.2

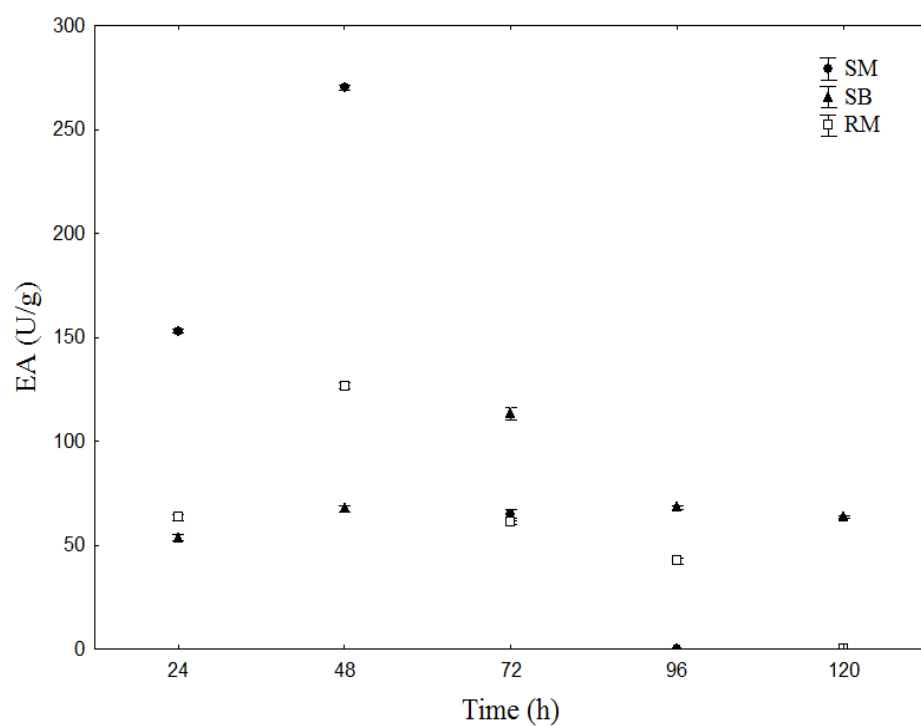
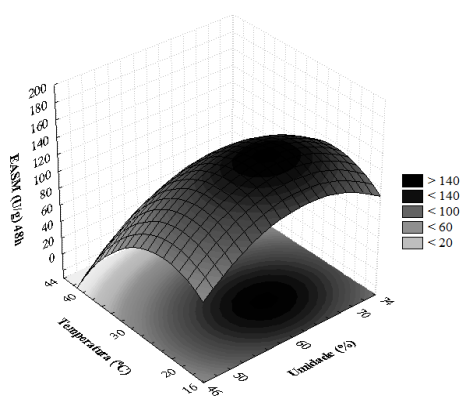
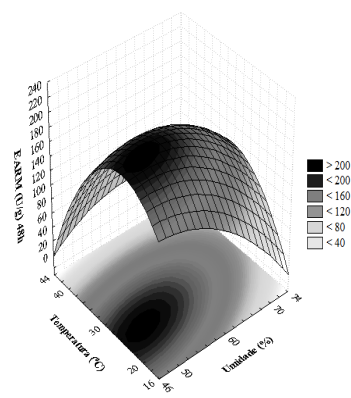


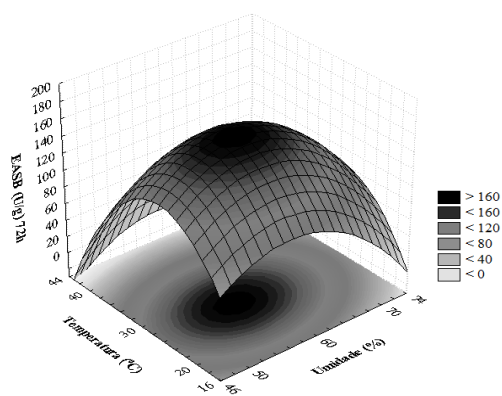
Figure 1. Kinetic of lipase production using sugarcane bagasse (SB), rice meal (RM) and soybean meal (SM) as substrates at 120 hours of fermentation, moisture content of 55% and 27°C.



(a)



(b)



(c)

Figure 2. Response surface for esterification activity using soybean meal (a) and rice meal (b) as substrates after 48 hours of fermentation and sugarcane bagasse (c) as substrate after 72 hours of fermentation.

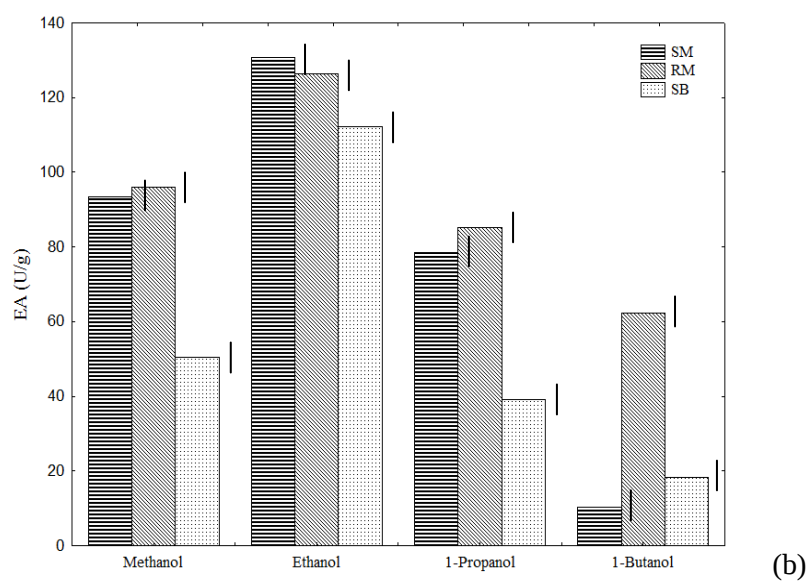
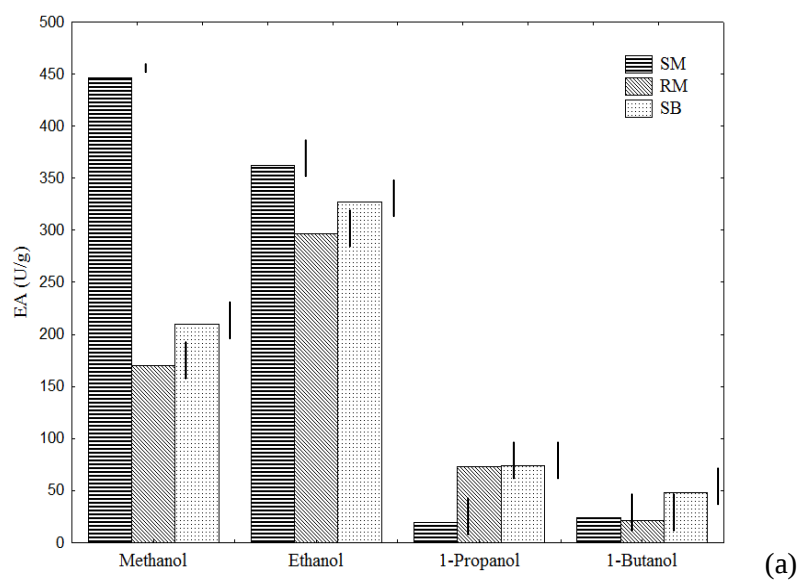


Figure 3. Lipase activities using butyric (a) and oleic (b) acids as acyl donators and different alcohols as substrates.

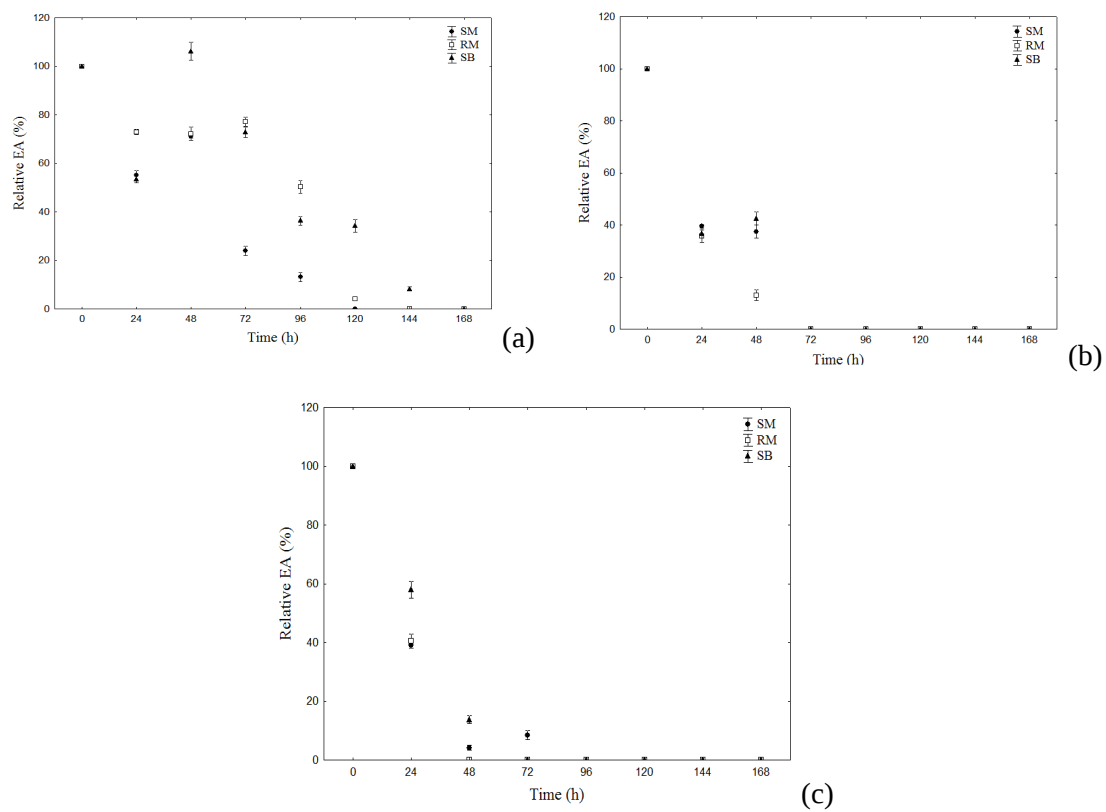


Figure 4. Thermal stability of crude enzymatic extracts at 35°C (a), 45°C (b) and 60°C (c).

Figure 5. Relative enzymatic activities (%) during the storage at 4°C (a), -10°C (b) and room temperature (about 25°C) (c), respectively.

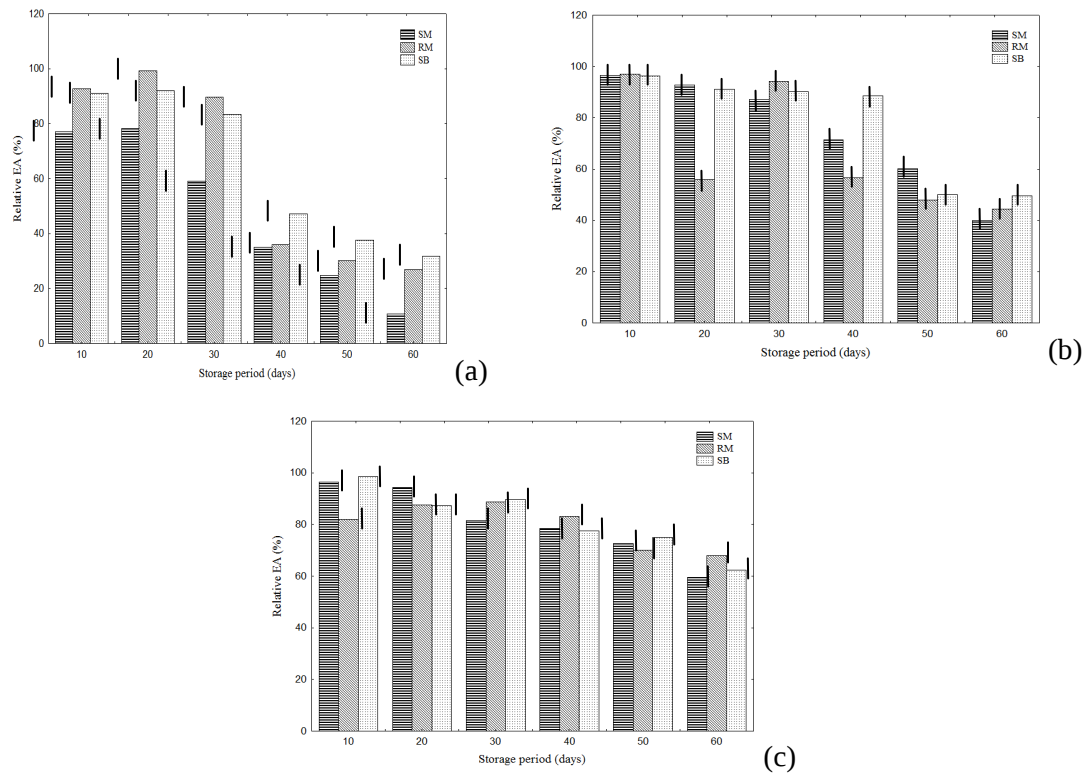


Figure 5. Relative enzymatic activities (%) during the storage at 4°C (a), -10°C (b) and room temperature (about 25°C) (c), respectively.