

**URI - CAMPUS ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum*  
utilizando torta de soja como substrato**

**Gean Delise Leal Pasquali Vargas**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

**ERECHIM, RS - BRASIL**

**MARÇO DE 2004**

**Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum*  
utilizando torta de soja como substrato**

Gean Delise Leal Pasquali Vargas

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Prof. Marco Di Luccio, D.Sc.  
Orientador

---

Prof. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc.

---

Prof. Débora de Oliveira, D.Sc.

Erechim, 02 de Março de 2004

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

*“Esta conquista dedico a você meu amor,  
meu querido Marcos”.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Marco Di Luccio pela oportunidade de poder trabalhar ao seu lado, pela sua disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos, e acima de tudo, obrigado pela dedicação, incentivo, minha eterna amizade e admiração.

À Prof. Helen Treichel pela boa vontade, apoio intelectual, pelos momentos de descontração e principalmente por sua amizade.

Às Prof. Francine Padilha e Eunice Valduga, por sua disponibilidade e afeição.

A minhas amigas Losiane, Elisandra e Clarissa a mais sincera gratidão por terem compartilhado minhas alegrias e tristezas.

Aos colegas e amigos do curso de mestrado e do Laboratório de Biotecnologia, pelos momentos de alegria e descontração, e pelas experiências compartilhadas.

À minha querida Cláudia, pelo carinho e paciência.

À bolsista Stéphanie Benetti, por sua disponibilidade, auxiliando sempre que lhe foi solicitado.

À minha família por acreditarem na minha capacidade e estarem sempre ao meu lado, “amo vocês.”

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

À URI-Campus de Erechim pelo apoio no desenvolvimento do projeto.

À FAPERGS por fornecer apoio financeiro (bolsas), viabilizando a realização do projeto.

À Secretaria de Ciência e Tecnologia do RS (Programa de Pólos de Inovação Tecnológica) pelo apoio financeiro ao projeto.

*“Procuramos tanto por algo que se chama felicidade que nessa busca incansável não vimos o quanto somos felizes. Esperamos tanto os melhores momentos que só*

*percebemos que eles existiram quando já se foram.”*

*(Desconhecido)*

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando  
torta de soja como substrato

Gean Delise Leal Pasquali Vargas

Março/2004

Orientador: Marco Di Luccio

As lipases têm conquistado uma faixa crescente do mercado de enzimas devido a sua vasta aplicação na indústria e a série de vantagens que apresenta, como a sua régio enâncio seletividade. No entanto, ainda é necessária a busca de novas alternativas de substratos e microorganismos produtores de lipases, visando diminuir os custos de obtenção destas enzimas. Neste trabalho investigou-se a produção de lipases por *P. simplicissimum* utilizando como substrato a torta de soja, que é um subproduto da indústria de óleo de soja. A influência da suplementação da torta com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, bem como os efeitos da temperatura e umidade da torta na produção da enzima foram investigados. Através da técnica de planejamento de experimentos foram avaliadas as atividades lipásica e proteásica, crescimento microbiano, umidade residual, atividade de água e pH. Observou-se que a temperatura de fermentação e a umidade da torta foram as variáveis que mais afetaram a produção da lipase por *Penicillium simplicissimum*. A maior produção da enzima ocorre em 27,5 °C e 55% de umidade, sendo a máxima

atividade lipásica obtida de cerca de 30 U/g. Além disso, pode-se constatar que a torta de soja já constitui um meio rico em nutrientes para o microorganismo, não havendo necessidade de adição de fontes suplementares de carbono e nitrogênio.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering

Assessment of production of lipase by *Penicillium simplicissimum* using soybean cake as substrate

Gean Delise Leal Pasquali Vargas

Março/2004

Advisor: Marco Di Luccio

Lipases have conquered an increasing share of enzyme market due to the large number of industrial applications and the number of advantages that such enzymes present, such as its regioenantioselectivity. However, the search for different substrates and microorganisms that produce lipase is still necessary to lower production costs of the enzyme. In this work the production of lipase by *P. simplicissimum* using soy cake as substrate was investigated. The effect of supplementation of the cake with different sources of carbon and nitrogen on lipase yield was studied, as well as the effects of temperature of incubation and moisture content of the cake. Experimental design technique was used to evaluate the effect of manipulated variables on lipase and protease activities, microbial growth, residual moisture, water activity and pH. Incubation temperature and cake moisture were the variables that most influenced lipase production by *P. simplicissimum*. The highest yield of lipase (30 U/g) was obtained at 27.5 °C and in the cakes with 55 wt% of moisture. It could also be concluded that soybean cake is a sufficiently nutrient rich medium for the microorganism, and the use of supplementary fonts of carbon and nitrogen is not necessary.

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	2
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1	Fermentação em Estado Sólido (FES)	5
2.1.1	Conceito	5
2.1.2	Histórico	5
2.1.3	Características da FES	6
2.1.4	Biorreatores e fermentação em estado sólido	10
2.1.5	Aplicações	12
2.2	Produção de Enzimas por Fermentação em Estado Sólido	13
2.2.1	Introdução	13
2.2.2	Produção de Lipases por Fermentação em Estado Sólido	14
2.2.3	Aplicações das Lipases	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Microorganismo	24
3.2	Preparo do Inóculo	24
3.3	Estudo da produção da lipase	25
3.3.1	Otimização da produção da lipase	25
3.3.2	Estudo da produção da Lipase em biorreator com agitação intermitente	27
3.4	Métodos analíticos	29
3.4.1	Caracterização dos substratos	29
3.4.2	Preparo das Amostras	29
3.5	Atividade Lipásica	31
3.6	Atividade Proteásica	32
3.7	Determinação da Umidade	33
3.8	Crescimento Microbiano	33
3.9	Atividade de água ( $a_w$ )	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
4.1	Caracterização do substrato e suplementos	36
4.2	Cinéticas de fermentação	37
4.3	Estudo da produção da lipase	42
4.3.1	Otimização da produção da lipase	42
4.4	Otimização da produção de lipase	51
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	72
5.1	Conclusões	72
5.2	Sugestões	72
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
7	Anexo i	87

## **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa catalisando as reações de hidrólise de triglicerídeos. Em baixas concentrações de água podem ainda catalisar reações de esterificação, transesterificação ou interesterificação. Além das vantagens clássicas das enzimas, as lipases microbianas apresentam uma série de vantagens se comparadas com as lipases extraídas de fontes animais e vegetais. Estas vantagens estão relacionadas a algumas das características peculiares das lipases como a sua região enâncio seletividade, a estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH (Essamri *et al.*, 1998; Maia *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2001; Gutarra *et al.*, 2003).

Atualmente as lipases vêm conquistando uma faixa crescente no mercado de enzimas, devido ao grande número de aplicações industriais. As lipases têm sido utilizadas na modificação de óleos e gorduras, formulação de detergentes, manufatura de alimentos, nos processos de síntese usados pela indústria de química fina e farmacêutica, manufatura de papel, produção de cosméticos, na indústria de combustíveis, como auxiliares no tratamento de efluentes gordurosos, dentre outras aplicações (Gandhi, 1997; Sharma *et al.*, 2001; Leal *et al.*, 2002; Pastore *et al.*, 2003).

No entanto, as enzimas disponíveis comercialmente apresentam ainda custo elevado, uma vez que a maioria dos processos de produção são baseados em fermentação submersa, o que muitas vezes pode tornar a sua utilização pouco atrativa economicamente (Castilho *et al.*, 2000). Assim, a busca por processos de produção de lipases que possam diminuir os custos finais da enzima são de grande interesse, pois pode viabilizar algumas aplicações pouco exploradas, como por exemplo o tratamento de efluentes gordurosos (Leal *et al.*, 2002).

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 microorganismo (Castilho *et al.*, 2000; Soccol e Vandenberghe, 2003; Pandey, 2003). Além disso, a FES apresenta uma série de vantagens sobre a

fermentação submersa, como altos rendimentos e facilidade na recuperação dos produtos (Sharma *et al.*, 2001).

A utilização de subprodutos agroindustriais como substrato na produção de lipases, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado como a torta de soja, 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).

Desta forma, estudos sobre a utilização de diferentes microorganismos e substratos para a produção de lipases em meio sólido podem contribuir no sentido de se encontrar combinações ideais para se obter lipases com altos rendimentos, utilizando substratos e condições operacionais que possibilitem a redução dos custos do processo de produção em escala industrial.

Muitos microorganismos são conhecidos como bons produtores de lipases quando cultivados em fermentação em estado sólido, devido à sua capacidade de crescer em meios que apresentem baixo teor de umidade. Dentro deste panorama, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de lipase por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium simplicissimum*, e um subproduto da indústria de óleo de soja como substrato. Investigou-se o efeito de algumas variáveis de processo e diferentes suplementações do meio sobre a produção de lipase em escala de bancada, utilizando a técnica de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta, visando obter condições que maximizem a produção de enzima.

Dentro dos objetivos deste trabalho também se inclui a avaliação, em caráter preliminar, de um biorreator, utilizando as condições otimizadas, avaliando-se ainda os efeitos de umidade e vazão de ar injetado sobre a produção de lipase.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Fermentação em Estado Sólido (FES)

#### 2.1.1 Conceito

A fermentação em estado sólido pode ser definida como o processo que envolve sólidos, em ausência ou quase ausência de água livre. Contudo, o substrato deve possuir umidade suficiente para dar suporte ao crescimento e sustentabilidade ao metabolismo do microorganismo (Germano, 2000; Pandey, 2003). Este tipo de processo fermentativo tem recebido atenção especial, devido à grande quantidade de enzimas extracelulares produzidas durante o processo, dentre outros metabólitos (Sato e Sudo, 1999).

#### 2.1.2 Histórico

A fermentação no estado sólido (FES) é provavelmente o método mais antigo utilizado pelo homem na obtenção de benefícios a partir de microorganismos (Germano, 2000). Vários tipos de alimentos utilizando esse processo fazem parte da dieta de diversos povos há muitos séculos. Nos países de origem Oriental, a FES tem uma importância primordial na produção de alimentos e bebidas alcoólicas tradicionais, como o molho de soja, dentre outros, cuja origem da produção data de 1000 a.C., (Bianchi *et al.*, 2001).

No final do século XIX, Takamine produziu uma enzima digestiva (takadiastase) através de FES utilizando o fungo *Aspergillus oryzae* e farelo de trigo como substrato. Este fato despertou o interesse da indústria para a busca de outras aplicações deste tipo de fermentação (Sato e Sudo, 1999).

A partir de 1940, com a descoberta da penicilina através da fermentação submersa, e sua enorme importância durante a Segunda Guerra Mundial, os processos de fermentação no estado sólido foram praticamente abandonados nos países ocidentais (Losane *et al.*, 1985; Pandey, 2003). Contudo, entre 1960-1970 a descoberta das micotoxinas, produzidas por fermentação em estado sólido, fez ressurgir o interesse neste tipo de processo (Pandey, 2003).

### 2.1.3 Características da FES

No processo de fermentação em estado sólido deve-se levar em consideração alguns aspectos importantes, como a seleção do microorganismo, a escolha do substrato, a otimização dos parâmetros do processo, o isolamento e a purificação do produto, dentre outros fatores (Pandey, 2003).

Uma das características principais da fermentação em estado sólido é a baixa atividade de água ( $a_w$ ) do meio. Baseando-se na classificação teórica, em termos de atividade de água, somente fungos e leveduras seriam microorganismos adequados para fermentação em estado sólido. Culturas de bactérias exigem alta atividade de água e portanto não seriam adequadas à FES. No entanto existem relatos que demonstram que bactérias podem ser usadas nestes processos, quando bem controladas e manipuladas (Pandey, 2003).

A água apresenta um papel primordial na FES, pois é a responsável pela difusão de solutos, gases, e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos relativos à presença da água em FES devem ser constantemente estudados para a avaliação dos efeitos causados no processo. Os efeitos da água na fisiologia fúngica devem ser bem investigados, pois o fluxo de água através da membrana é responsável pela manutenção da pressão intracelular. No que diz respeito aos efeitos macroscópicos, a presença ou não da água afeta significativamente a taxa de crescimento radial, a evolução da germinação, esporulação e atividade metabólica das colônias, uma vez que se a quantidade de água não for suficiente para manter as propriedades funcionais de algumas enzimas,

a perda de atividade enzimática pode levar ao desequilíbrio na cadeia metabólica das células (Gervais e Molin, 2003). Assim, o controle deste parâmetro pode ser usado para modificar a produção metabólica ou excreção de um microorganismo (Pandey, 2003).

A seleção de um substrato próprio é outro aspecto chave da fermentação em estado sólido. O material sólido não solúvel pode atuar apenas como suporte físico ou ainda exercer a função de suporte e de fonte de nutrientes para o microorganismo (substrato). 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).

Enzimas hidrolíticas extracelulares e outros metabólitos são em muitos casos produzidas em grande quantidade em fermentações em estado sólido. Embora não se conheça a razão clara deste fato, esta característica é de extrema importância para a sua aplicação (Sato e Sudo, 1999).

Outras características básicas da FES são (Bianchi *et al.*, 2001; Sato e Sudo, 1999):

- A distribuição microbiana, o crescimento e a formação de produto ocorrem principalmente na superfície sólida;
- O calor gerado durante o crescimento e metabolismo do microorganismo eleva a temperatura do leito de substrato causando a redução da umidade do meio;
- Os microorganismos geralmente utilizados são espécies que podem produzir amilases, com a finalidade de degradar o amido e penetrar dentro do substrato sólido, essas espécies apresentam morfologias diferentes, quanto ao tipo de micélios (aéreas e submersas) com diferentes atividades fisiológicas;
- O cultivo é geralmente estacionário, devido à dificuldade de agitação do meio. A agitação pode causar danos às células em alguns casos. Nos casos em

que é necessária a agitação utilizam-se fermentadores de leite fluidizado, leite fixo e de tambor rotativo.

A principal vantagem da utilização da fermentação em estado sólido se dá na utilização de substratos com baixo valor agregado. Além desta, existem outras vantagens que estão resumidas a seguir (Sato e Sudo, 1999; Palma *et al.*, 2000; Germano, 2000; Bianchi *et al.*, 2001; Pandey e Soccol, 2001; Gervais e Molin, 2003):

- pode-se adicionar nutrientes suplementares ao substrato sólido;
- o volume de meio reacional é reduzido, implicando em um menor investimento capital em biorreatores;
- os esporos dos microorganismos podem ser utilizados diretamente na inoculação, evitando etapas prévias como pré-cultivos que envolvem grandes volumes de meio e tanques para seu desenvolvimento;
- o crescimento dos fungos ocorre em condições similares às do seu habitat natural;
- o fato de o meio de cultivo apresentar baixa atividade de água reduz o problema de contaminações, especialmente por bactérias;
- a aeração do meio é facilitada devido ao maior espaço entre as partículas e pela difusão do oxigênio na água utilizada para umidificar o meio;
- altos rendimentos quanto à formação de metabólitos, e simplicidade nas etapas de purificação, pois os produtos estarão concentrados no líquido da extração;

Embora a fermentação em estado sólido tenha se mostrado extremamente vantajosa quanto a custos e facilidades, esta também apresenta alguns problemas que dificultam a sua aplicação (Sato e Sudo, 1999; Germano, 2000; Bianchi *et al.*, 2001; Pandey e Soccol, 2001). A fermentação em estado sólido normalmente é restrita a microorganismos capazes de crescer em sistemas com baixa umidade. No entanto, já existem alguns relatos de processos de FES utilizando bactérias (Pandey, 2003).

Outro problema clássico encontrado em processos de FES está na difícil remoção do calor produzido devido à atividade metabólica microbiana e dificuldade de controle dos parâmetros da fermentação, principalmente em processos em grande escala. Este problema se deve em grande parte à dificuldade de homogeneização do meio reacional, além dos problemas difusionais característicos de processos envolvendo meios sólidos (Pandey e Soccol, 2001; Sato e Sudo, 1999; Palma *et al.*, 2000; Germano, 2000; Bianchi *et al.*, 2001; Von Meien e Mitchell, 2002; Mitchell *et al.*, 2003a). Vários autores têm tentado contornar estes problemas através de projetos de biorreatores adequados, conforme será descrito mais adiante.

Na FES a utilização de altos níveis de água diminui a porosidade do meio, o que dificulta a penetração do oxigênio e facilita contaminações por bactérias. Em contrapartida, meios com baixa umidade podem dificultar a acessibilidade dos nutrientes, resultando em um crescimento microbiano reduzido (Gervais e Molin, 2003; Pandey, 2003). A Figura 2.1 apresenta um diagrama esquemático dos fenômenos microscópicos e macroscópicos envolvidos em um processo de FES (Mitchell *et al.*, 2003b).

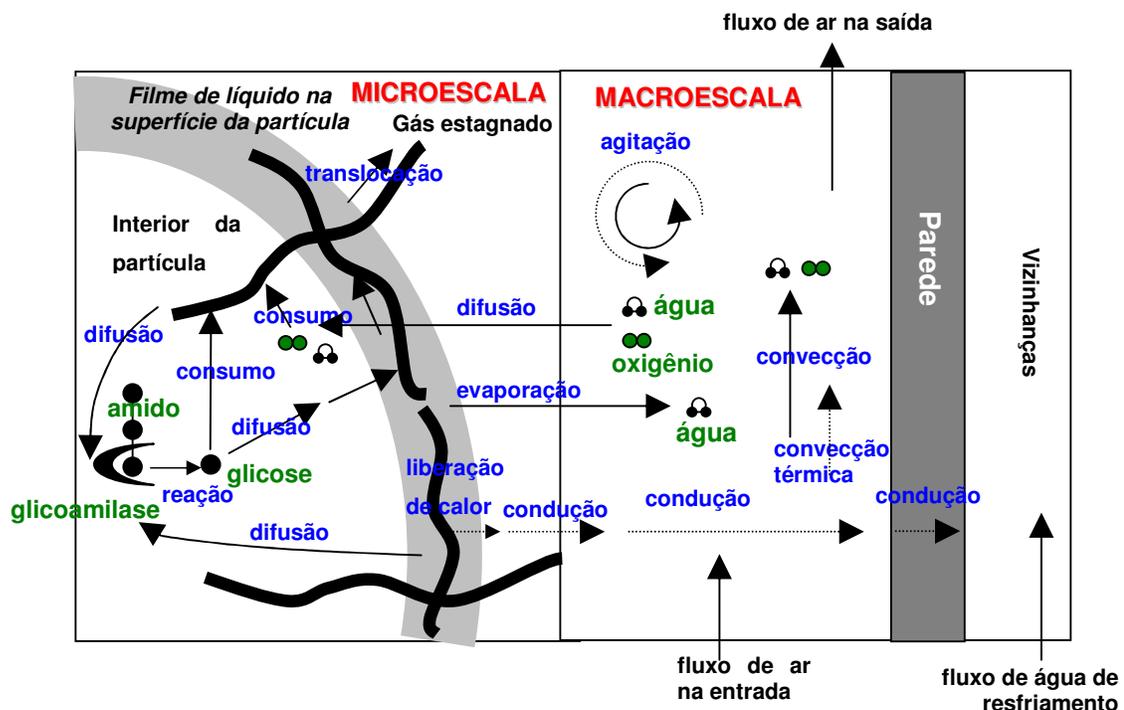


Figura 2.1: Diagrama esquemático de alguns fenômenos de transporte envolvidos no processo de FES (Adaptada de Mitchell *et al.*, 2003b).

Outro ponto complexo é a dificuldade na determinação do crescimento microbiano. A biomassa não pode ser determinada de forma direta, pois os microorganismos se encontram intimamente ligados ao substrato. Estudos cinéticos do crescimento microbiano na FES, descrevem um baixo nível de desenvolvimento, normalmente associado a fatores como a heterogeneidade do substrato, complexidade da interação micélio/substrato e a determinação indireta da biomassa (Soccol *et al.* 1994; Germano, 2000). Apesar das dificuldades encontradas na determinação do crescimento microbiano em FES, técnicas que utilizam a medição do O<sub>2</sub> consumido e CO<sub>2</sub> liberado durante a fermentação vêm sendo utilizadas, além de outras medidas indiretas, como dosagem de glicosamina da parede celular de fungos, ergosterol ou proteína celular (Durand, 1997; Koutinas *et al.*, 2003; Mitchell *et al.*, 2003b;).

#### 2.1.4 Biorreatores e fermentação em estado sólido

Os biorreatores mais comumente utilizados em processos em estado sólido são os biorreatores em bandeja, tambor rotativo, de leito fixo e de leito fluidizado (Bianchi, 2001; Robinson e Nigam, 2003; Mitchel *et al.*, 2003b).

Na aplicação de biorreatores em escala industrial e piloto os maiores problemas identificados estão relacionados à transferência de calor e massa, causados por compactação do meio, criação de caminhos preferenciais, que por sua vez levam à aeração deficiente. No entanto, estes problemas podem ser minimizados através de estratégias como a circulação de ar ao redor do leito do substrato e através deste, e ainda a utilização de diferentes estratégias de agitação do leito. No entanto, a questão da agitação deve ser examinada com cautela, uma vez que fungos que não apresentem septo nas hifas podem ser pouco resistentes à agitação mecânica (Durand, 2003).

Os reatores mais simples são os reatores em bandeja e os de colunas de leito fixo. Em escala de laboratório comumente se utilizam placas de Petri, erlenmeyeres de boca larga, béqueres, e outros tipos de recipientes que promovam uma boa superfície de contato entre o meio e o ar atmosférico. Usualmente em escala reduzida somente se controla a temperatura do ambiente no qual o frasco contendo o meio inoculado é incubado. Este tipo de estratégia é apropriada para avaliações iniciais sobre os tipos de microorganismos e meios adequados ao processo de interesse, por ser prática e fácil de se trabalhar com um grande número de experimentos (Mitchell *et al.*, 2003b; Durand, 2003).

Biorreatores de leito fixo também são bastante utilizados em escala laboratorial. Neste tipo de biorreator o meio pré-inoculado é acondicionado em colunas pequenas que são incubadas em banho termostático. Ar úmido é forçado através do leito, buscando expandir o mesmo, aumentando a superfície de contato e assim propiciando uma melhor transferência de calor. O ar utilizado deve ser saturado em água para minimizar a evaporação. Este sistema facilita o acompanhamento do crescimento microbiano através de técnicas de respirometria (Sato e Sudo, 1999; Mitchell *et al.*, 2003a). Este equipamento também apresenta outras vantagens como o baixo custo e uso relativamente fácil (Durand, 2003).

Em ambos os casos, não se encontram problemas referentes ao acúmulo de calor no interior do leito, devido ao pequeno volume de meio normalmente utilizado. No entanto, em escala piloto ou industrial os biorreatores de leito fixo apresentam como desvantagem a dificuldade de se obter um crescimento microbiano uniforme e na dissipação do calor (Losane *et al.*, 1985; Robinson e Nigam, 2003). Assim, a formação de gradientes de temperatura durante a fermentação é inevitável e outras estratégias devem ser utilizadas.

Em um processo industrial, a temperatura utilizada na fermentação é o fator limitante da altura do leito. Nos estágios iniciais do processo de fermentação, a temperatura e a concentração de oxigênio são iguais em todo o leito. No entanto, com o decorrer do processo, surgem problemas na difusão de oxigênio e transferência de calor, por compactação e encolhimento do meio. O calor e gases gerados nas biorreações tendem a se acumular no leito, formando gradientes. Este

problema é bastante complexo e pode afetar o controle de dois parâmetros fundamentais como a temperatura e o conteúdo de água no meio sólido, que por sua vez podem levar a mudanças nas condições operacionais, prejudicando o andamento do processo (Sangsurasak e Mitchell, 1998; Bianchi, 2001; Raghavarao *et al.*, 2003; Durand, 2003; Robinson e Nigam, 2003).

Nos biorreatores de tambor rotativo, o uso da rotação promove a agitação e aeração do meio, sendo que estes biorreatores podem ainda ser utilizados em processos contínuos. Durante a fermentação é possível se fazer uma pulverização de água na superfície do leito, permitindo desta forma o uso de ar seco para remover o calor gerado durante a fermentação. No entanto, no substrato pode haver problemas de aglomeração ou atrito. O uso da agitação pode promover e facilitar a transferência de massa e calor e uma distribuição mais uniforme dos nutrientes (Sato e Sudo, 1999; Mitchell *et al.*, 2003b; Robinson e Nigam, 2003).

Poucas melhorias têm sido desenvolvidas em termos de biorreatores para FES. Na maioria dos casos, o escalonamento se baseia em procedimentos empíricos e na mecanização de fermentadores de leito ou bandejas, utilizando-se agitadores mecânicos planetários ou diferentes tipos de tambores rotativos (Durand, 2003). No entanto, avanços significativos têm sido realizados no sentido de desenvolver abordagens quantitativas da transferência de calor e massa em biorreatores de FES (Mitchell *et al.*, 2003a) e desenvolvimento de modelos matemáticos de biorreatores e de crescimento microbiano (Von Meien e Mitchel, 2002; Mitchell *et al.*, 2003a).

### **2.1.5 Aplicações**

A FES tem sido utilizada no desenvolvimento de vários bioprocessos, envolvendo ainda a biorremediação e biodegradação de compostos perigosos e desintoxicação biológica de resíduos agroindustriais (Brand *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2002). Este tipo de fermentação tem mostrado também um enorme potencial tecnológico no que diz respeito ao desenvolvimento de produtos que apresentam componentes derivados de microorganismos como rações para animais, produtos

para a indústria alimentícia, química e farmacêutica. Estas aplicações envolvem a biotransformação de produtos e resíduos agrícolas para enriquecimento nutricional, produção de biomassa, e formação produtos com alto valor agregado, como metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo antibióticos, alcalóides, enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, micro-pesticidas e bioerbicidas, biossufactantes, biocombustíveis, compostos aromáticos, etc. (Pandey, 2003).

Muitos estudos sobre aplicações da FES envolvem a agregação de valor a resíduos agroindustriais, uma vez que a base da economia brasileira atual está voltada diretamente à produção agroindustrial. A produção ou processamento de diversos grãos e insumos agrícolas envolve a geração de resíduos que têm sido utilizados como substrato ou suporte para FES. Dentre os resíduos mais utilizados pode-se citar os resíduos de café (borra, casca) (Pandey *et al.*, 2000a; Soccol e Vandenberghe, 2003), bagaço de cana de açúcar (Pandey *et al.*, 2000b; Vandenberghe *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2003;), farelos e torta de soja (Bramorski *et al.*, 1998; Abdel-Fattah e Olama, 2002; Capra *et al.*, 2003; Germano *et al.*, 2003), trigo (Camero *et al.*, 1997; Ghanem *et al.*, 2000; Couri *et al.*, 2000; Bertolin *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003; Pastore *et al.*, 2003), gergelim (Kamini *et al.*, 1998), babaçu (Gombert *et al.*, 1999; Palma *et al.*, 2000) e bagaço de mandioca (Palma *et al.*, 2002).

## **2.2 Produção de Enzimas por Fermentação em Estado Sólido**

### **2.2.1 Introdução**

A produção de enzimas é uma área da biotecnologia em expansão, movimentando bilhões de dólares anualmente (Viniegra-González *et al.*, 2003). Hoje, aproximadamente 4.000 enzimas são conhecidas, e destas, cerca de 200 são usadas comercialmente, sendo que a maioria das enzimas industriais é de origem microbiana (Sharma *et al.*, 2001).

Comparando a produtividade volumétrica obtida nos processos de fermentação em estado submerso com a fermentação em estado sólido, a FES tem mostrado grande superioridade na produção de enzimas, (Meira *et al.*, 2003; Dominguez *et al.*, 2003) apresentando um desempenho 10 vezes maior (Durand, 2003). Usualmente se considera que os rendimentos de enzimas obtidas por FES são superiores aos obtidos por fermentação submersa. No entanto, não existe nenhuma metodologia para se comparar os rendimentos em cada tipo de fermentação em termos reais, e nem se sabe ainda a razão exata para que isto ocorra. O motivo mais provável seria o fato de que na FES as culturas estariam mais próximas do seu habitat natural, e assim a sua atividade seria maior (Pandey, 2003).

Dentre os diversos tipos de enzimas que podem ser produzidas a partir da fermentação em estado sólido, as mais estudadas são as lipases (Palma *et al.*, 2000; Capra *et al.*, 2003; Dominguez *et al.*, 2003), xilanases (Ghanem *et al.*, 2000; Rezende *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2003;), proteases (Couri *et al.*, 2000; Germano *et al.*, 2003), invertases, pectinases, tanases (Viniestra-González *et al.*, 2003), lignoceluloses (Tengerdy e Szakacs, 2003), glicoamilases (Bertolin *et al.*, 2001), entre outras, mostrando assim o enorme potencial da FES no mercado de enzimas.

A maior parte destes estudos têm investigado a utilização de substratos e suporte provenientes de resíduos agroindustriais e avaliam as condições de fermentação em reatores de bancada utilizando modos de operação em batelada. Os autores mostram a importância do monitoramento das condições de cultivo, como temperatura, pH, umidade e atividade de água do meio, bem como os efeitos causados por diferentes tipos de suplementação do meio na produção de enzimas.

### **2.2.2 Produção de Lipases por Fermentação em Estado Sólido**

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica aquosa catalisando as reações de hidrólise de triacilglicerídeos, resultando na formação de diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos, ácidos graxos e glicerol (Voet e Voet, 1995, Sharma *et al.*, 2001). No entanto,

dependendo das condições reacionais como baixa concentração de água, as lipases podem também catalisar a síntese, de mono, di ou triacilglicerol a partir de ácidos graxos e glicerol (Jaeger *et al.*, 1994; Maia *et al.*, 2001).

Muitas lipases são ativas em presença de solventes orgânicos, onde elas catalisam um grande número de reações, incluindo esterificação (Sharma *et al.*, 2001), transesterificação, acilação regioseletiva de glicóis e mentóis, e síntese de peptídeos (Ducret *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001).

As lipases propiciam a quebra de emulsões de ésteres, gliceras e ácidos graxos de cadeia longa, como por exemplo a trioleína e tripalmitina (Sharma *et al.*, 2001).

Ambas lipases e esterases são capazes de catalisar a hidrólise de ésteres, embora apenas as lipases atuem sobre ésteres insolúveis em água como os triglicérides (Freire, 1996). As lipases apresentam um modo de ação semelhante ao das esterases, porém sua atividade aumenta em muito quando situadas na interface polar/apolar. Talvez isto ocorra devido ao fato de uma parte da superfície da enzima se encontrar em melhor equilíbrio termodinâmico quando inserida na interface polar/apolar, colocando o sítio ativo da enzima em posição favorável para a catálise (Pastore *et al.*, 2003).

As lipases são glicoproteínas ácidas, que em sua maioria apresentam uma quantidade de carboidratos na faixa de 2 a 15%, como resíduos glicosídicos de manose, xilose, galactose e arabinose. Através de estudos de lipases com diferentes seqüências de aminoácidos e obtidas de diferentes fontes, observa-se que estas enzimas apresentam um peso molecular entre 22 e 60 kDa (Freire, 1996).

Lipases podem ser encontradas em células de tecidos animais e vegetais e podem ainda ser produzidas por microorganismos como bactérias, fungos e leveduras (Sharma *et al.*, 2001; Pastore *et al.*, 2003).

As lipases microbianas demonstram um enorme potencial biotecnológico, por apresentarem fatores peculiares como estabilidade em solventes orgânicos, não requerem cofatores, possuem especificidade de substratos, que dependerá do tipo

de reação e de substrato, e exibem uma alta enâncioseletividade e enâncioespecificidade (Elibol e Ozer, 2000).

Muitos microorganismos como fungos filamentosos, bactérias e leveduras são conhecidos como bons produtores de lipases. Dentre estes, se pode citar algumas das espécies que vem sendo mais investigadas: *Fusarium solani* (Maia *et al.*, 2001), *Penicillium restrictum* (Freire *et al.*, 1997a,b; Gombert *et al.*, 1999), *Penicillium citrinum* (Miranda *et al.*, 1999), *Penicillium chrysogenum* (Ferrer *et al.*, 2000), *Rhizopus arrhizus* (Elibol e Ozer, 2002; Mahadik *et al.*, 2002), *Rhizopus oligosporus* (Ul-Haq *et al.*, 2002), *Aspergillus niger* (Kamini *et al.*, 1998; Mahadik *et al.*, 2002), *Candida rugosa* (Rao *et al.*, 1993; Benjamin e Pandey, 2001), *Yarrowia lipolytica* (Corzo e Revah, 1999; Dominguez *et al.*, 2003), *Rhizomucor pusillus* e *Rhizopus rhizopodiformis* (Cordova *et al.*, 1998).

A maioria dos microorganismos produtores são mesofílicos, sendo normalmente utilizadas temperaturas de incubação de cerca de 30 °C. No entanto alguns microorganismos termofílicos podem ser utilizados, como é o caso da *Humicola lanuginosa* e o *Tolorymyces emersoni* (Pastore, 2000). Os fungos filamentosos têm sido amplamente empregados pela indústria nos processos de produção de lipases (Maras *et al.*, 1999; Novozymes, 2003).

As lipases microbianas apresentam uma série de vantagens se comparadas as de origem animal e vegetal, uma vez que são enzimas extracelulares em sua grande maioria, são facilmente separadas do micélio por filtração ou centrifugação (Essamri *et al.*, 1998), o processo pode ser facilmente conduzido (Jesus *et al.*, 1999), possuem alta velocidade de síntese e alto rendimento de conversão de substrato em produto (Leal, 2000). Além disso, são enzimas termoestáveis (Corzo e Revah, 1999; Sharma *et al.*, 2001) e apresentam versatilidade e simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva (Sharma *et al.*, 2001). No caso de FES, o uso de substratos de baixo custo pode ainda reduzir os custos da operação do processo (Dominguez *et al.*, 2003).

A estabilidade das lipases microbianas em presença de solventes orgânicos é uma característica que vem sendo amplamente investigada, pois esta pode vir a

possibilitar a realização de reações onde não é possível a presença de água (Essamri *et al.*, 1998; Maia *et al.*, 1999).

Comparando a relação de microorganismos citados na literatura como produtores de lipase, com os microorganismos para a obtenção de lipases comerciais, verifica-se que esta última é bastante reduzida, pois as informações reportadas na literatura sobre a produção de lipases microbianas ainda se baseiam em estudos exploratórios em escala de bancada, sendo poucos os dados disponíveis sobre a produção de lipase em escala industrial (Pastore, 2000).

Apesar de todos os avanços obtidos atualmente, objetivando maximizar a síntese das lipases através do uso das cepas microbianas já conhecidas, é fundamental buscar ferramentas como melhoramentos genéticos, tecnologia de DNA recombinante, análises genômicas, de forma a tornar estes microorganismos apropriados para o uso comercial (Bennett, 1998; Fungaro e Maccheroni Jr., 2002)

No entanto, a seleção de cepas selvagens hiperprodutoras ainda é uma técnica de grande importância, principalmente em países que apresentam uma grande biodiversidade como o Brasil (Freire e Castilho, 2000).

Enzimas de interesse industrial, como as lipases, são produzidas tradicionalmente por fermentação submersa. No entanto, a FES pode ser uma alternativa bastante interessante quando se utilizam rejeitos de baixo custo como meio de fermentação (Gombert *et al.*, 1999; Palma *et al.*, 2000; Gutarra *et al.*, 2003).

Vários trabalhos têm reportado o uso de resíduos proveniente da agroindústria na produção de lipase por fermentação em estado sólido. Estes são utilizados como fonte de nutrientes para o crescimento microbiano. Resíduos como os da indústria de óleos vegetais (óleo de oliva, óleo de soja, óleo de babaçu, óleo gergelim, óleo de semente de girassol, óleo de coco) (Cordova *et al.*, 1998; Kamini *et al.*, 1998; Gombert *et al.*, 1999; Palma *et al.*, 2000; Capra *et al.*, 2003; Leal *et al.*, 2003) e subprodutos como farelo de casca de trigo (Bertolin *et al.*, 2001; Benjamin e Pandey, 2001; Mahadik *et al.*, 2002; Ul-Haq *et al.*, 2002; Meira *et al.*, 2003), farelo de cevada (Dominguez *et al.*, 2003), farelo de arroz (Rao *et al.*, 1993) dentre outros, vêm sendo utilizados.

A produção de lipase por FES, em alguns casos, mostra-se altamente dependente da relação de carbono/nitrogênio e do tipo de fonte de carbono do meio (Gombert *et al.*, 1999; Dominguez *et al.*, 2003), por isso estudos utilizando diferentes fontes suplementares de carbono e nitrogênio, com o objetivo de enriquecer o meio e induzir a síntese da lipase vêm sendo desenvolvidos.

Recentemente vários trabalhos buscam elucidar os efeitos causados pela adição de nutrientes, e a presença de indutores durante o processo de produção da lipase, em estado sólido ou submerso (Freire *et al.*, 1997b; Maia *et al.*, 1999; Gombert *et al.*, 1999; Corzo e Revah, 1999; Pastore, 2000; Palma *et al.*, 2000; Maia *et al.*, 2001; Elibol e Ozer, 2002; Dominguez *et al.*, 2003). Em alguns casos, o uso de suplementações tem possibilitado aumentos razoáveis na capacidade produtiva dos microorganismos. Contudo, alguns trabalhos que utilizam a FES para a produção de lipase mostram que dependendo da composição do substrato utilizado na fermentação a adição de fontes suplementares de carbono e nitrogênio é desnecessária (Kamini *et al.*, 1998).

O uso de triglicerídeos como fonte de carbono é adequado para crescimento celular e produção de enzima, embora a indução da biossíntese da lipase em presença de ácidos graxos livres ou triglicerídeos seja controverso (Freire *et al.*, 1997b). A presença de materiais que apresentam lipídeos no meio de cultura usualmente aumenta em muito os níveis de atividade lipásica (Dominguez *et al.*, 2003).

Outros fatores que afetam a produção de lipase extracelular por fermentação em estado sólido são o pH do meio durante o processo de produção, a temperatura de condução da fermentação, a aeração e a composição do meio (Dominguez *et al.*, 2003).

Estudos mostram que as lipases microbianas produzidas por FES se mantêm estáveis na faixa de pH entre 5,0 a 8,0 e apresentam maior atividade na faixa de temperatura de 30 a 40°C, no entanto, algumas lipases têm mostrado níveis de estabilidade consideráveis mesmo em temperaturas extremas, como 5°C e 60°C (Freire *et al.*, 1997a; Kamini *et al.*, 1998; Maia *et al.*, 1999; Ferrer *et al.*, 2000; Benjamin e Pandey, 2001; Pastore *et al.*, 2003). No entanto, algumas lipases

produzidas através de fermentação em estado sólido são enzimas sensíveis quanto à presença de proteases e aumentos no pH do meio, tendo sua atividade comprometida por estes fatores (Gombert *et al.*, 1999; Benjamin e Pandey, 2001).

### 2.2.3 Aplicações das Lipases

Atualmente, as lipases dominam cerca de 5 % do mercado mundial de enzimas. Entretanto nota-se uma inclinação ao crescimento deste mercado, devido ao vasto número de aplicações reveladas (Palma *et al.*, 2000).

As lipases têm encontrado um vasto campo de atuação nas indústrias, sendo utilizada em diversas aplicações como no processamento de óleos e gorduras, formulação de detergentes, processamento de alimentos, nos processos de síntese usados pela indústria de química fina e farmacêutica, manufatura de papel, produção de cosméticos, na indústria de combustíveis na modificação de ésteres, no processamento de peles, como biossensores pela indústria médica, na determinação de lipídeos no sangue e no tratamento de efluentes (Gandhi, 1997; Sharma *et al.*, 2001; Leal *et al.*, 2002; Pastore *et al.*, 2003).

As propriedades características peculiares das lipases têm propiciado um vasto crescimento nas aplicações dentro da indústria de óleos e gorduras, cujo processo produz cerca de 100 milhões de toneladas de matéria-prima ao ano (Freire *et al.*, 1997a). As lipases apresentam uma série de características interessantes para a indústria de óleos e gorduras, como a sua capacidade hidrolítica de cadeias de ésteres de triacilglicerol, e de reação reversa, ou seja, a síntese de ésteres em baixas concentrações de água. Assim, a utilização de lipases em processamentos oleoquímicos tem resultado na redução dos gastos de energia e minimizado problemas relacionados à degradação térmica durante os processos de alcoólise, acidólise, hidrólises e glicerólises (Sharma *et al.*, 2001). As lipases vem sendo utilizadas na modificação das propriedades de misturas de triglicerídeos objetivando

a produção de margarinas, gorduras dietéticas e gorduras especiais como a manteiga de cacau (Freire, 1996).

A modificação enzimática de óleos que contém um alto percentual de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) é um processo que apresenta excelentes perspectivas comerciais, uma vez que estes são facilmente sujeitos à decomposição no processo por via química (Freire e Castilho, 2000).

Devido à sua habilidade em hidrolisar gorduras, as lipases têm sido amplamente utilizadas como aditivo pela indústria de limpeza e detergentes, sendo que os detergentes que apresentam lipases em sua composição são especialmente seletivos (Sharma *et al.*, 2001). A idéia da utilização de enzimas como as lipases, proteases, amilases e celulasas na fabricação de agentes de lavagem enzimática (detergentes biológicos) não é nova, sendo que desde meados de 1960, esta vem sendo uma das principais aplicações de enzimas (Novozymes, 2003). Embora as manchas ocasionadas por proteínas sejam facilmente digeridas pelas enzimas, as manchas de óleos e gorduras são de difícil remoção, devido às baixas temperaturas utilizadas nas lavagens. Assim, em 1988 a Novo Nordisk (atual Novozymes) colocou no mercado um produto contendo lipase fúngica desenvolvida mediante aplicação de engenharia genética, denominado comercialmente “Lipolase”. Todavia, outros produtos, como “Lumafast” e o “Lipomax”, já apresentam lipases extracelulares em sua formulação com estabilidade e atividade ótimas sob condições de lavagem (Freire e Castilho, 2000; Sharma *et al.*, 2001).

A utilização de lipases na prática não tem sido maior devido aos custos de produção e as restrições de estabilidade necessárias à sua aplicação. Atualmente, estes problemas estão sendo resolvidos mediante a utilização de lipases com propriedades compatíveis com as condições de aplicação e a obtenção de rendimentos de fermentação elevados viabilizando economicamente a sua utilização (Freire, 1996).

A tecnologia da aplicação de lipases pela indústria alimentícia tem utilizado as reações de hidrólise e síntese com o objetivo de reduzir algumas gorduras presentes na manteiga de cacau, que dificultam a sua utilização na fabricação de chocolates (Undurruga *et al.*, 2001). No entanto, as lipases são utilizadas em diversos campos

da manufatura de alimentos. Estas enzimas também são amplamente utilizadas no melhoramento da textura de massas, pela indústria de panificação, na redução do período de maturação de alimentos cárneos e queijos, no desenvolvimento de aromas e sabores, na hidrólise de gorduras do leite, modificação de gorduras presentes em manteigas, na produção de condimentos e essências, dentre outras aplicações (Freire e Castilho, 2000; Sharma *et al.*, 2001).

O uso das lipases em sínteses químicas orgânicas tem se tornado essencial para a indústria farmacêutica, química fina e cosmética, devido às suas características peculiares. Desta forma, a estereo-seletividade das lipases vem sendo usada na resolução de misturas de ácidos orgânicos racêmicos em sistemas imiscíveis ou bifásicos (Sharma *et al.*, 2001) e na remoção seletiva de certos compostos. Lipases em meio orgânicos sem presença de água livre, são conhecidas por catalisar reações de grande interesse científico e comercial, como as biotransformações e as sínteses (Klibanov, 1997; Ducret, 1998). O uso de lipases na síntese de compostos enâncio puros tem sido amplamente discutido (Itoh *et al.*, 1998; Sharma e Chattopadhyay, 2000).

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) livres e seus mono e diglicerídeos são subseqüentemente usados para produzir uma variedade de produtos farmacêuticos, como anti-colesterolênicos, anti-inflamatórios dentre outros (Gill e Valivety, 1997; Belarbi *et al.*, 2000). As lipases também estão sendo utilizadas no processo de produção de outros medicamentos como antidepressivos, anti-hipertensivos e vasodilatadores (Freire e Castilho, 2000).

A indústria de cosméticos e perfumaria tem desenvolvido processos, que empregam lipases na produção de emulsificantes, aromas, surfactantes e emolientes que fazem parte da composição de cremes (Leal, 2000; Sharma *et al.*, 2001).

O uso de lipases na indústria de manufatura de papel surgiu a partir de 1991 (Freire, 1996). A utilização das lipases no tratamento da polpa de papel tem contribuído consideravelmente, reduzindo a decomposição de resinas nos cilindros de secagem, fato este que afetava a produtividade e a qualidade do papel, com isto

tornando desnecessárias as limpezas freqüentes dos cilindros (Freire, 1996; Jaeger e Reetz, 1998).

As lipases também podem ser utilizadas para acelerar os processos de degradação de gorduras em detritos industriais e no tratamento de efluentes. Atualmente, a aplicação de lipases tem sido também sugerida na degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais, gerados em frigoríficos e abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral (Gandhi, 1997; Masse *et al.*, 2001; Pastore *et al.*, 2003; Rigoni *et al.*, 2003; Mendes e Castro, 2003). Efluentes que contém elevados teores de gorduras apresentam elevada Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). A degradação biológica desses rejeitos é um processo lento, tendo como etapa limitante a liberação de ácidos graxos pelos microorganismos com atividade lipolítica. Assim a adição de lipases pode auxiliar na redução do tempo de retenção hidráulica e aumentar significativamente a eficiência do processo (Pereira *et al.*, 2002; Mendes e Castro, 2003).

Algumas lipases produzidas através de fermentações em estado sólido já estão sendo utilizadas na realização de hidrólise enzimática de efluente de laticínios, como uma etapa que antecede ao tratamento biológico em reator de lodos ativados de batelada seqüencial. Os resultados obtidos com o efluente previamente hidrolisado, mostram que é possível se obter remoções de Demanda Química de Oxigênio (DQO) acima de 90 %, independentemente do teor de gordura no meio (Jung *et al.*, 2002). Outros trabalhos utilizando lipases produzidas por FES mostram que o pré-tratamento enzimático é eficiente na redução da DQO do efluente de laticínios, facilitando a operação de reatores do tipo manta de lodo (UASB) (Cammarota *et al.*, 2001).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Microorganismo

O fungo *Penicillium simplicissimum* foi isolado previamente por Freire (1996) a partir do flotado da fermentação natural das amêndoas de babaçu. Este fungo foi selecionado como um bom produtor de lipases utilizando-se metodologias de seleção em meio sólido e líquido descritas na literatura (Freire, 1996). O fungo foi estocado em meio sólido constituído por (p/v): amido solúvel 2%, óleo de oliva 1%, extrato de levedura 0,1%,  $\text{CaCO}_3$  0,5%,  $\text{MgSO}_4$  0,025%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05% e ágar 2% sob refrigeração, sendo que novos repiques foram realizados a cada três meses.

#### 3.2 Preparo do Inóculo

O meio para produção do inóculo era constituído por (p/v): amido solúvel 2%, óleo de oliva 1%, extrato de levedura 0,1%,  $\text{CaCO}_3$  0,5%,  $\text{MgSO}_4$  0,025%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05% e ágar 2%. Os componentes do meio foram solubilizados, sendo então feito o ajuste do pH a 5,5 com HCl 0,1 N. O meio foi emulsificado utilizando-se um mixer manual (Britânia) e 100 mL de meio foram transferidos para erlenmeyeres de 500 mL. Estes foram então autoclavados durante 30 minutos a 1,0 atm. Após a autoclavagem estes erlenmeyers foram inoculados com 100  $\mu\text{L}$  de suspensão de esporos obtida a partir do tubo estoque, sendo então incubados por sete dias a 30 °C. A coleta dos esporos foi realizada adicionando-se 10 mL de solução de Tween 80 0,1% (v/v) e pérolas de vidro estéreis ao erlenmeyer para uma melhor remoção dos esporos. Estes então foram estocados a 4 °C, na mesma solução, por 15 dias.

### 3.3 Estudo da produção da lipase

#### 3.3.1 Otimização da produção da lipase

O substrato utilizado em todos os experimentos consistiu de torta de soja (resíduo da indústria do óleo de soja obtido após a prensagem dos grãos) obtida do moinho Olfar localizado em Erechim (RS). Esta torta foi moída, peneirada (Tyler 35-60) e armazenada em freezer até o momento da sua utilização. Em uma primeira etapa, as fermentações foram conduzidas em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica. Para que as condições de produção de lipase fossem otimizadas utilizou-se a técnica de planejamento fatorial de experimentos e análise de superfície de resposta.

Primeiramente avaliou-se o efeito da temperatura de incubação, umidade inicial da torta, tipo de suplementação e concentração da suplementação. Os efeitos destas variáveis foram determinados através um planejamento fatorial fracionário do tipo Taguchi e os níveis estudados, determinados com base na experiência prévia do grupo (Capra *et al*, 2003) e trabalhos disponíveis na literatura (Castilho, 2003), estão apresentados na Tabela 3.1. Os suplementos testados foram o óleo de soja puro (Soya) e o efluente bruto de frigorífico (obtido em um frigorífico de suínos da região de Erechim), como fonte adicional de carbono ao meio; e água de maceração de milho (AMM) e hidrolisado de levedura (HL), como fontes adicionais de nitrogênio. A água de maceração de milho consiste no resíduo da indústria de extração de amido e glúten e foi fornecida pela empresa de Refinações de Milho do Brasil Ltda. O hidrolisado de levedura era obtido no próprio laboratório segundo a metodologia descrita no Anexo I.

Tabela 3.1: Níveis das variáveis estudadas no primeiro planejamento experimental

Nível	-1	0	+1
Temperatura (°C)	25	32,5	40
Umidade (%)	40	60	80
Tipo de fonte de Carbono*	OS	OS + EF	EF
Concentração fonte de C (%)	1	4,5	8
Concentração fonte de N** (%)	1	4,5	8

\*OS = óleo de soja; EF = efluente de frigorífico

\*\* O planejamento foi realizado uma vez com hidrolisado de levedura (HL) e outra com água de maceração de milho (AMM) como fonte de suplementação de nitrogênio.

Conhecendo-se as variáveis que possuem efeito significativo na produção da lipase, partiu-se para a otimização desta produção através de um planejamento experimental completo  $2^2$ , com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais. Nesta etapa foram estudadas a variável temperatura e umidade, utilizando-se a torta de soja sem nenhuma suplementação. Os níveis estudados neste planejamento estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Níveis das variáveis estudadas no segundo planejamento experimental

Nível	-1,41	-1	0	1	+1,41
Temperatura (°C)	15	18,63	27,5	36,37	40
Umidade%	30	37,27	55	72,73	80

Nos dois planejamentos experimentais realizados em béqueres (Figura 3.1), cada ensaio foi realizado em duplicata sendo o ponto central realizado em triplicata. Os béqueres de cada ponto experimental continham 10 g de torta de soja (em base seca). Para a realização das suplementações com efluente de frigorífico, óleo de soja, hidrolisado de levedura e água de maceração de milho foi preparada uma emulsão com água deionizada, homogeneizando-se com mixer por 3 minutos. A concentração da emulsão foi ajustada de acordo com a umidade final desejada na torta, levando-se em consideração a quantidade de água presente no inóculo.

As emulsões foram adicionadas por gotejamento manual com auxílio de pipeta automática, de forma que toda a área da torta fosse recoberta, melhorando assim a homogeneidade do meio. Os béqueres foram então fechados com manta acrílica e

autoclavados a 1 atm por 30 minutos. Após o resfriamento, estes foram então inoculados com uma suspensão de esporos, previamente diluída até a concentração de esporos desejada, para a obtenção do teor de umidade final previsto em cada experimento, e se obter uma concentração de esporos na torta de  $10^8$  esporos/g de torta seca. A concentração de esporos da suspensão de estoque foi determinada em câmara de Neubauer após diluição adequada.

Os béqueres foram então incubados em estufa a temperatura variada, conforme definido pelo planejamento de experimentos, com injeção de ar umidificado, de forma a se manter a umidade interna da câmara em 99 %. As amostras foram retiradas periodicamente para a determinação da cinética em alguns experimentos e posteriormente em 48 e 67 horas de fermentação.



Figura 3.1: Béqueres utilizados para a FES

### 3.3.2 Estudo da produção da Lipase em biorreator com agitação intermitente

Além dos experimentos em béqueres, foram realizados experimentos com biorreatores com agitação intermitente. Os reatores foram construídos em vidro e polipropileno no próprio laboratório. A Figura 3.2 apresenta a montagem experimental dos biorreatores.



Figura 3.2: Biorreatores utilizados no processo fermentativo

Em cada experimento pesou-se 70 g de torta de soja em béqueres de polipropileno, a umidade da torta foi ajustada, levando-se em consideração a água presente no inóculo e a umidade final desejada no experimento. Os béqueres foram então fechados com manta acrílica e autoclavados a 1 atm por 30 minutos. Após o resfriamento, estes foram então inoculados com uma suspensão de esporos, previamente diluída para se obter a concentração de  $10^8$  esporos/g de torta seca, levando-se em consideração ainda a umidade final desejada. Após a inoculação do meio, este foi transferido para os reatores, cuja assepsia era realizada por exposição à luz ultravioleta em câmara de fluxo laminar por 18h. A temperatura de incubação foi fixada com base nos resultados dos planejamentos de experimentos anteriores em 27,5 °C. Nestes experimentos foi utilizada a torta de soja sem nenhuma suplementação e variou-se apenas o teor de umidade inicial da torta e a vazão de ar injetada no biorreator, segundo um planejamento de experimentos fatorial completo  $2^2$ , com 3 pontos centrais. Os níveis estudados estão apresentados na Tabela 3.3.

A injeção de ar dentro dos reatores foi controlada por meio de um rotâmetro para gases. Antes de chegar ao interior dos reatores, o ar foi umidificado através da passagem em um recipiente com água, a fim de se manter a umidade do meio. Diariamente, retirava-se cerca de 6 g de amostra de cada reator, após

homogeneização manual em câmara de fluxo. Cada experimento foi conduzido por 7 dias.

Tabela 3.3: Níveis das variáveis estudadas no terceiro planejamento experimental

<b>Experimento</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+ 1</b>
<b>Umidade (%)</b>	40	50	60
<b>Vazão (L/min)</b>	1	4,5	8

### **3.4 Métodos analíticos**

#### **3.4.1 Caracterização dos substratos**

A caracterização da torta de soja e do hidrolisado de levedura foi feita seguindo as normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985). As análises realizadas na torta de soja foram: umidade, lipídios, nitrogênio e cinzas. Na caracterização do efluente de frigorífico foram realizadas análises de lipídeos, cinzas, umidade, nitrogênio e DQO. Os dados da composição da água de maceração de milho foram obtidos da empresa Refinações de Milho do Brasil Ltda. A caracterização da torta de soja, quanto ao teor de carbono foi fornecida por Castilho (2003) sendo que está análise foi realizada no Instituto de Química da UFRJ e os dados referentes ao óleo de soja foram obtidos da U.S. Department of Agriculture (USDA, 2004).

#### **3.4.2 Preparo das Amostras**

As amostras de meio fermentado foram cominuídas e de cada uma delas retirava-se 3 alíquotas de 0,5 g para análise de umidade, pH e atividade de água. O restante do material foi pesado e adicionado a 45 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. A mistura foi então incubada em agitador orbital a 35 °C e 160 rpm por 30 minutos. Em seguida foi feita a extração da fração líquida por prensagem

manual em filtro de nylon e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de atividade lipásica e proteásica. A fração sólida retida no filtro foi utilizada para dosagem de glicosamina, que foi utilizada como medida indicativa do crescimento microbiano (Aidoo *et al.*, 1981). A Figura 3.3 apresenta a rotina de análise das amostras.

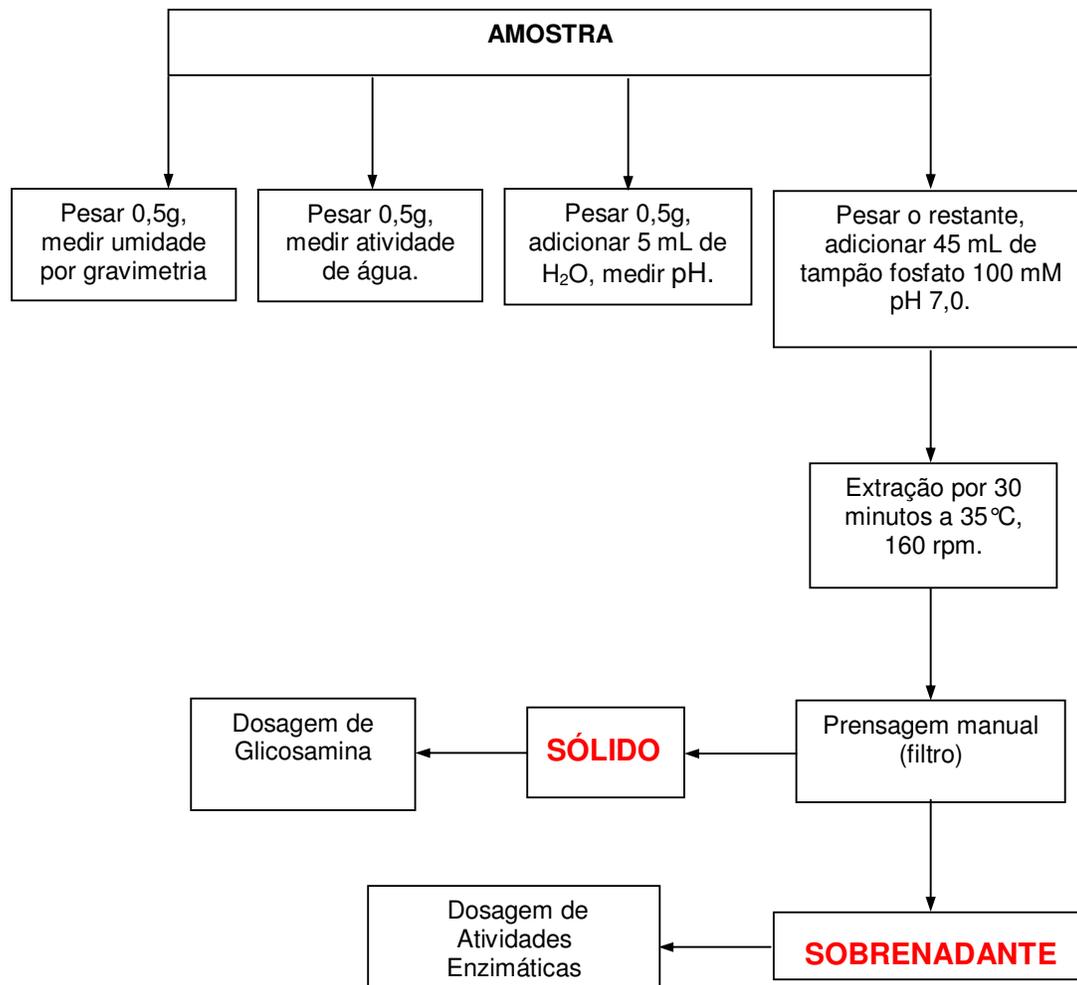


Figura 3.3: Fluxograma da rotina de análise das amostras

### 3.5 Atividade Lipásica

Para a dosagem da atividade lipásica utilizava-se como substrato uma emulsão com óleo de oliva 10 % (p/v) e goma arábica 5 % (p/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. A 18 mL desta emulsão eram adicionados 2 mL da amostra. Após incubação por 15 minutos a 37 °C com agitação de 160 rpm, a reação foi interrompida e os ácidos graxos extraídos através da adição de uma solução de acetona-etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados durante a reação foram então titulados até pH 11 com solução 0,1 N de NaOH. Os brancos reacionais foram preparados adicionando-se a amostra juntamente com a solução de acetona-etanol e então titulados. As dosagens de atividade foram feitas em duplicata, com exceção do ponto central dos planejamentos, que foi feito em triplicata. Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima, que pode ser determinada através da Equação 3.1 (Leal, 2000).

$$A = \frac{(V_a - V_b).N.1000}{t.V_c} \quad (3.1)$$

Onde:

A = atividade lipásica (U/mL)

V<sub>a</sub> = volume da amostra titulada (mL)

V<sub>b</sub> = volume do branco titulado (mL)

V<sub>c</sub> = volume da amostra usada na reação (mL)

t = tempo de reação (minutos)

N = normalidade da solução de NaOH

### 3.6 Atividade Proteásica

Em tubos de polipropileno de 1,5 mL foram adicionados 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de solução de azocaseína<sup>1</sup> 0,5% (p/v) preparada em tampão acetato 50 mM pH 5,0. Os tubos foram então incubados durante 15 minutos<sup>2</sup> a 37°C. Após o período de incubação a reação enzimática foi interrompida adicionando-se 0,5 mL de solução de ácido tricloro-acético (TCA) 10% (p/v), em banho de gelo. Os tubos com a mistura foram centrifugados a 12.900 x g por 20 minutos. Retirava-se então 1 mL do sobrenadante, ao qual foi adicionado 1 mL de solução de hidróxido de potássio 5 N. Fazia-se então a determinação da absorbância da solução por espectrofotometria em 428 nm. O branco das reações era preparado adicionando-se a amostra após a adição do TCA. O branco do aparelho foi preparado substituindo-se o volume de amostra por tampão acetato 50 mM pH 5,0. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença unitária de absorbância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio. Determinada através da Equação 3.2 (Charney e Tomarelli, 1947).

$$A = \frac{(Abs_a \cdot f_a - Abs_b \cdot f_b)}{t \cdot V_a} \quad (3.2)$$

Onde:

A = atividade proteásica (U/mL)

Abs<sub>a</sub> = leitura de absorbância da amostra

Abs<sub>b</sub> = leitura de absorbância do branco

f = fator de diluição

t = tempo de reação (minutos)

V<sub>a</sub> = volume de amostra (mL)

---

<sup>1</sup> Detalhes sobre o preparo desta solução se encontram no Anexo I.

<sup>2</sup> Tempo determinado após acompanhamento cinético da reação utilizando algumas amostras.

### 3.7 Determinação da Umidade

A umidade foi determinada por gravimetria, através da perda de água sofrida pela amostra (0,5 g) após 12 horas em estufa a 105° C.

### 3.8 Crescimento Microbiano

Como forma indireta de quantificar o crescimento celular foi utilizada a dosagem de glicosamina, segundo Aidoo *et al.* (1981). Adicionavam-se 5 mL de uma solução de ácido clorídrico 6 N a 0,5 g de amostra, colocando-se a mistura em banho de água fervente por duas horas. Em seguida a amostra foi resfriada e filtrada a vácuo. Do sobrenadante, transferia-se 1 mL para um balão de 25 mL, adicionando-se uma gota de solução alcoólica de fenolftaleína 0,5% (p/v). Logo após, a neutralização foi efetuada adicionando-se solução de hidróxido de sódio 3 N, até que a mistura atingisse a coloração rosa. Procedia-se então à titulação reversa com uma solução de KHSO<sub>4</sub> 1%, até que a coloração rosa desaparecesse. O volume do balão foi então completado com água destilada.

Após a etapa de extração descrita acima, tomava-se 1 mL da solução e adicionava-se à mesma 1 mL de solução de acetil acetona<sup>3</sup> em Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 N, colocando a mistura em banho de água fervente por 20 minutos. Após o resfriamento das amostras, adicionava-se 6 mL de etanol, em seguida, 1 mL de reagente de Erlich<sup>4</sup>. Os tubos foram então incubados a 65° C por 10 minutos, e a absorbância era lida em 530 nm. O branco foi preparado adicionando-se água no lugar da amostra.

---

<sup>3</sup> Detalhes sobre preparo desta solução, ver Anexo I

<sup>4</sup> Idem nota 3.

### 3.9 Atividade de água ( $a_w$ )

As análises de atividade de água foram realizadas utilizando-se o aparelho Aqualab CX-2. A calibração inicial do aparelho foi feita utilizando água Milli-Q® (Millipore), até a obtenção de três leituras consecutivas idênticas ( $a_w = 1.000$ ), a 27°C. O segundo ponto de calibração foi feito utilizando-se uma solução salina de NaCl com  $a_w$  de 0,817, também se realizando leituras até a obtenção de 3 leituras consecutivas iguais. Para a análise da atividade de água do meio, pesava-se 0,5 g de amostra que foi colocada no frasco de leitura, efetuando-se então leituras até a obtenção de três resultados consecutivos idênticos.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Caracterização do substrato e suplementos

A Tabela 4.1 apresenta os resultados da caracterização da torta de soja e dos suplementos utilizados neste trabalho. Em uma análise preliminar, pode-se considerar que a torta de soja é um meio rico em nutrientes e, portanto, possa constituir-se em um substrato adequado à fermentação. De fato, ao se comparar a composição deste meio com outras tortas provenientes da agroindústria, observa-se que o teor de nitrogênio (proporcional ao teor de proteína) da torta de soja é cerca do dobro do teor de nitrogênio de outras tortas como a de babaçu (Gombert *et al.*, 1999; Palma *et al.*, 2000; Leal *et al.*, 2003, Castilho, 2003), de coco, de arroz, farelo de trigo (UI-Haq *et al.*, 2002) e torta de oliva (Cordova *et al.*, 1998). Ainda assim, optou-se por se realizar um estudo sistemático da suplementação da torta de soja com outros componentes de baixo custo, a fim de se verificar as necessidades nutricionais do microorganismo para maximizar a produção de lipase.

Todos os suplementos utilizados, com exceção do óleo de soja (OS), contêm alto teor de umidade, que foi levada em consideração nos ajustes de umidade dos meios durante os experimentos. O hidrolisado de levedura (HL) e a água de maceração de milho (AMM), ao contrário do efluente de frigorífico (EF) apresentam alto teor de nitrogênio, sendo considerados então bons suplementos para incrementar o teor deste componente no meio. Já o efluente e o óleo de soja, foram considerados fontes suplementares de carbono ao meio. É interessante observar o alto valor da DQO do efluente, o que significa que este possui alto teor de matéria orgânica oxidável. Boa parte desta consiste em óleos e gorduras, como pode ser observado pelo alto valor do teor de lipídeos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Caracterização química do substrato e dos suplementos

Análise	Torta de soja	Efluente de frigorífico	Óleo de soja <sup>a</sup>	Hidrolisado de levedura	Água maceração de milho <sup>b</sup>
Umidade (%)	3,0	89,2	0	67,5	55,0
Proteína (%)	42,5	0,14	0	17,5	18,8
Lipídeos (%)	8,5	3,1	100	0,05	1,0
Carboidrato (%) <sup>c</sup>	30	6,5	0	5,8	7,5
Fibras (%)	10 <sup>a</sup>	n.d. <sup>d</sup>	0	8,0 <sup>a</sup>	13
Cinzas (%)	6,0	1,1	0	1,2	4,5
Nitrogênio (%)	6,8	0,02	0	2,8	3,0
Carbono (%)	45,4 <sup>e</sup>	n.a. <sup>f</sup>	77,4	n.a.	15,9
DQO (g/L) <sup>g</sup>	-	2.000	-	-	-

<sup>a</sup>Fonte: USDA (2004)

<sup>b</sup>Fonte: Refinações de Milho do Brasil Ltda.

<sup>c</sup>por diferença

<sup>d</sup>não detectado (< 0,01%)

<sup>e</sup>Castilho, (IQ/UFRJ, 2003)

<sup>f</sup>não avaliado

<sup>g</sup>Demanda Química de Oxigênio

## 4.2 Cinéticas de fermentação

O primeiro planejamento foi montado com o objetivo de elucidar quais os efeitos causados pela adição de nutrientes e variações de temperatura e umidade na síntese da lipases por fermentação em estado sólido. Antes da realização do planejamento, porém, optou-se por realizar algumas condições, acompanhando-se a cinética da fermentação, através do monitoramento das atividades lipásica, proteásica e de água, umidade e pH. A temperatura foi fixada em 40 °C (limite superior do planejamento) e a umidade foi testada nos dois níveis (40 e 80%). Como suplemento de fonte de nitrogênio utilizou-se em todos os ensaios o hidrolisado de levedura. Como fonte suplementar de carbono foram testados os óleos de soja e oliva e o efluente de frigorífico. O objetivo deste acompanhamento cinético foi identificar a fase de máxima produção de lipase e protease. Pode-se ainda obter uma avaliação preliminar dos efeitos de diferentes suplementos, além da queda do teor de umidade do meio, um problema típico deste tipo de fermentação.

Como se pode observar através da Figura 4.1, para todos os experimentos obteve-se baixa atividade proteásica até cerca de 48 h. Após este tempo, há um aumento mais acentuado desta, com exceção do experimento realizado com alto

teor de umidade inicial e de suplementos, sugerindo que uma alta umidade associada ao elevado teor de carbono e nitrogênio tenham efeito inibitório. Observe-se, analogamente, um aumento do pH ao longo do tempo de fermentação (Figura 4.2), mais acentuado após o início do crescimento da atividade proteásica. Este efeito possivelmente está relacionado à proteólise, que gera aminoácidos, cuja desaminação libera amônia para o meio (Freire *et al.*, 1997b; Palma *et al.*, 2000). Os incrementos de atividade proteásica e pH ao longo do tempo de fermentação neste trabalho foram bem inferiores aos relatados pela literatura, onde a atividade proteásica chega a atingir cerca de 8 U/g e pH em torno de 8,0 (Maia *et al.*, 1999; Gombert *et al.*, 1999; Palma *et al.*, 2000). No entanto, o comportamento cinético da atividade proteásica é similar ao observado nestes trabalhos, mostrando que a produção de proteases só ocorre após um certo tempo de fermentação.

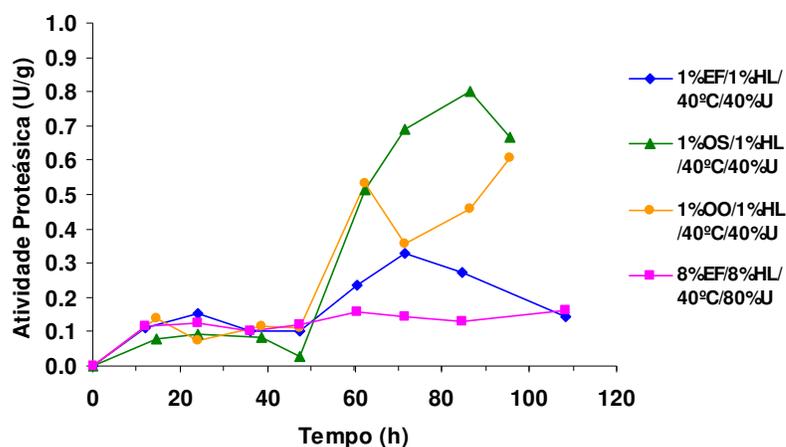


Figura 4.1: Cinética de produção de protease em diferentes condições experimentais.

Na maioria dos experimentos obteve-se elevada atividade lipásica em torno de 65 a 75 h de fermentação, com exceção do experimento com alta umidade inicial e alta concentração de suplementos, conforme pode ser observado na Figura 4.3. Este comportamento já dá indicativos de ocorrência de inibição por excesso de substratos, o que é confirmado pelos resultados do primeiro planejamento, que serão apresentados mais adiante.

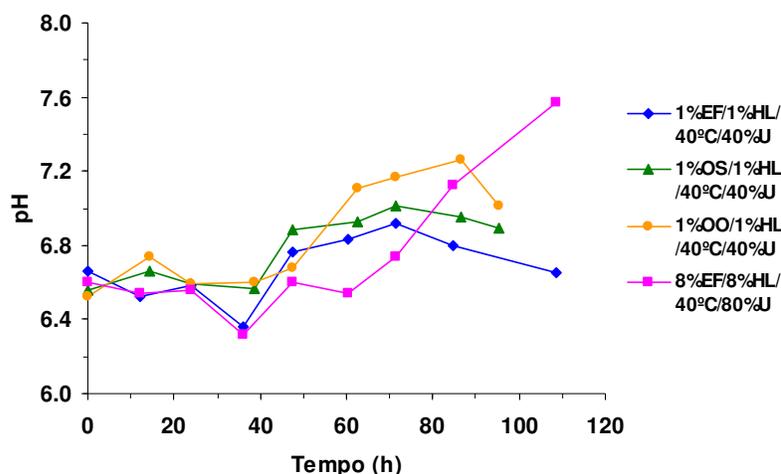


Figura 4.2: Variação do pH ao longo do tempo de fermentação em diferentes condições experimentais

É interessante notar que não se observa um pico de atividade lipásica claramente. Em muitos estudos sobre produção de lipase por FES (Gombert *et al.*, 1999; Palma *et al.*, 2000; Leal *et al.*, 2003) e em fermentação submersa (Corzo e Revah, 1999) é comum a ocorrência do pico na atividade lipásica. No entanto é possível se encontrar relatos onde não se observa queda na atividade lipásica em fermentações conduzidas por até 12 dias (Maia *et al.*, 1999; Dominguez *et al.*, 2003).

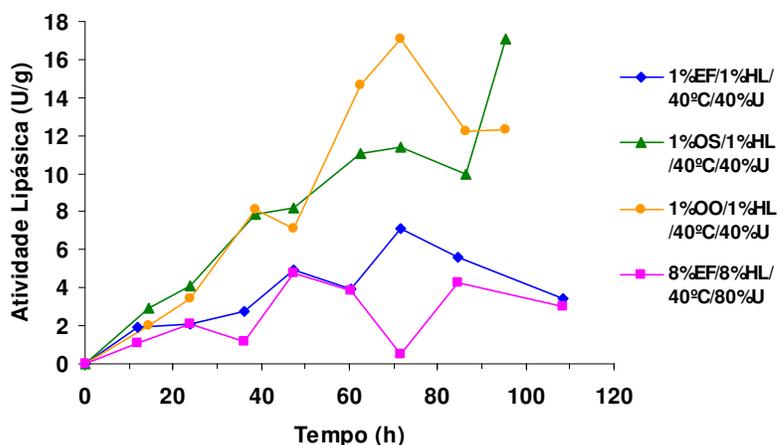


Figura 4.3: Cinética de produção de lipase em diferentes condições experimentais

A princípio, um aumento da atividade proteásica ou a alcalinização do meio levaria à queda na atividade lipásica, conforme demonstrado por Gombert *et al* (1999). No entanto, é interessante ressaltar que a lipase produzida pelo *Penicillium simplicissimum* não é afetada pela proteólise e pelo pH contrariando os resultados observados nos trabalhos com o fungo *Penicillium restrictum* (Gombert, 1999; Palma, 2000). Esta é uma característica desejável quando se busca maximizar a produção de lipases. Este comportamento pode ser relacionado à baixa atividade proteásica obtida, sendo ainda confirmado através da obtenção de baixos coeficientes de correlação ( $r < 0,7$ ) entre as atividades lipásica e proteásica. As duas cinéticas foram apresentadas em um mesmo gráfico (Figura 4.4), para melhor visualização. Na Figura 4.3 pode-se ainda observar que, nas mesmas condições experimentais, o óleo de oliva e o de soja levam a maiores taxas de produção de lipase. No entanto, em 48 de fermentação, a diferença entre as atividades obtidas utilizando estes suplementos é reduzida.

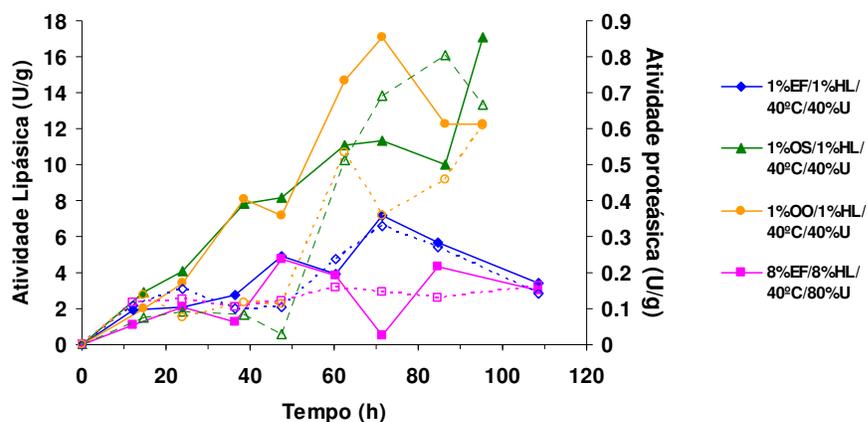


Figura 4.4: Comparação das cinéticas de produção de lipase e protease em diferentes condições de cultivo.

A evolução da umidade residual do meio e a atividade de água ao longo da fermentação podem ser observadas nas Figuras 4.5 e 4.6. Ambas apresentaram comportamentos similares, conforme o esperado. Observa-se também que a umidade e a atividade de água se mantêm até cerca de 60 h de fermentação, apresentando queda acentuada no caso do experimento com baixo teor de umidade inicial e utilizando o efluente como fonte suplementar de carbono. Este

comportamento sugere que a utilização de óleo como suplemento restringe a evaporação de água do sistema reduzindo a perda de umidade nos experimentos conduzidos com esta fonte de carbono.

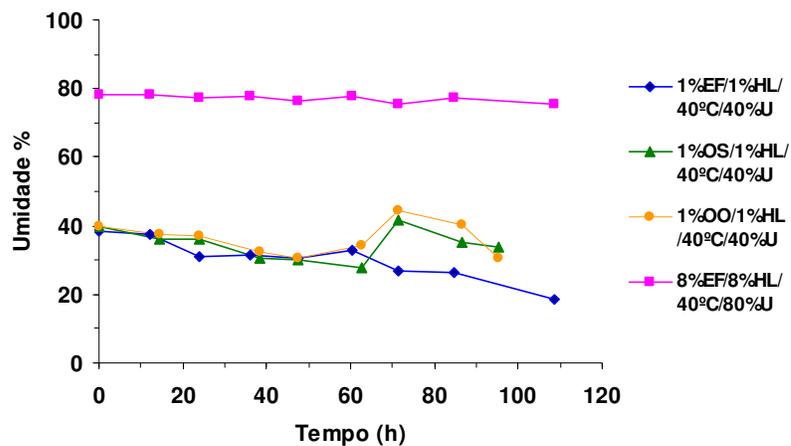


Figura 4.5: Evolução da umidade residual no meio durante a fermentação.

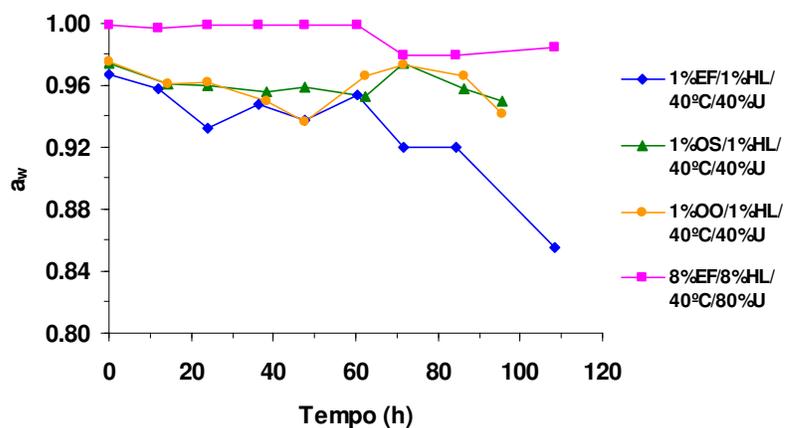


Figura 4.6: Evolução da atividade de água do meio durante a fermentação.

### 4.3 Estudo da produção da lipase

#### 4.3.1 Otimização da produção da lipase

Na primeira etapa do estudo de otimização da produção da lipase realizaram-se dois planejamentos experimentais fracionários do tipo Taguchi, para que os principais efeitos das variáveis em estudo pudessem ser avaliados.

#### ***Planejamento Fatorial utilizando Hidrolisado de Levedura como fonte suplementar de nitrogênio.***

A Tabela 4.2 apresenta a matriz do primeiro planejamento com os valores reais, codificados e as respostas para a atividade lipásica. Em uma análise preliminar, pode-se notar que as condições experimentais 2, 4, 10 e 11 foram as que permitiram se obter a maior atividade lipásica. É interessante notar que todas estas condições se basearam em uma baixa umidade inicial do meio. Observa-se também que a baixa umidade e níveis maiores de temperatura favorecem a atividade metabólica aumentando a concentração de glicosamina. Os menores valores para atividade lipásica foram obtidos em níveis maiores de umidade, como no ponto central (60%) e nos experimentos com 80% de umidade inicial. Possivelmente o alto teor de umidade reduz a porosidade do meio dificultando a penetração do oxigênio e assim interferindo no metabolismo microbiano, ou ainda pode prejudicar a transferência de calor do meio (Pandey, 2003).

A Tabela 4.3 apresenta outras respostas obtidas no primeiro planejamento experimental. Na maioria dos experimentos, a perda de umidade foi inferior a 5%, com exceção para os experimentos 9 a 12, que foram realizados com baixa umidade inicial (40%) e alta temperatura (40°C), o que favorece a perda de água por evaporação. Entretanto, mesmo em condições de baixa umidade (<30%), a atividade de água do meio ainda está dentro da faixa considerada ótima ( $a_w > 0,8$ ) para o crescimento de fungos (Farkas, 1997) embora, como se pode observar pelos

resultados de teor glicosamina para estes experimentos, houve menor crescimento do fungo, quando comparado aos outros experimentos. Pode observar-se ainda que o menor crescimento foi obtido no ensaio 10, que além de menor umidade, foi realizado com elevado teor de óleo de soja, sugerindo que o excesso de óleo pode ter causado a inibição da troca gasosa entre o fungo e o ar prejudicando o crescimento microbiano. Entretanto, deve-se destacar a dificuldade em avaliar os resultados referentes ao crescimento microbiano, pois o microorganismo pode apresentar comportamento distinto, em relação ao teor de glicosamina, ao administrarem-se diferentes tipos de suplementos.

Tabela 4.2: Matriz do planejamento experimental fracionário (valores reais e codificados) com as respostas da atividade lipásica após 48h de fermentação, utilizando hidrolisado de levedura como fonte suplementar de nitrogênio.

Ensaio	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Tipo de fonte de Carbono*	Concentração fonte de C (%)	Concentração fonte de N(%)	Atividade Lipásica (U/g)
1	25(-1)	40(-1)	OS(-1)	1(-1)	1(-1)	5,5±2,1
2	25(-1)	40(-1)	OS(-1)	1(-1)	8(1)	6,4±1,6
3	25(-1)	40(-1)	EF(1)	8(1)	1(-1)	5,3±0,6
4	25(-1)	40(-1)	EF (1)	8(1)	8(1)	5,9±2,0
5	25(-1)	80(1)	OS(-1)	8(1)	1(-1)	2,9±2,7
6	25(-1)	80(1)	OS(-1)	8(1)	8(1)	2,4±2,0
7	25(-1)	80(1)	EF (1)	1(-1)	1(-1)	3,5±3,5
8	25(-1)	80(1)	EF(1)	1(-1)	8(1)	4,0±1,4
9	40(1)	40(-1)	OS(-1)	8(1)	1(-1)	3,3±2,1
10	40(1)	40(-1)	OS(-1)	8(1)	8(1)	6,7±0,7
11	40(1)	40(-1)	EF(1)	1(-1)	1(-1)	6,6±5,4
12	40(1)	40(-1)	EF(1)	1(-1)	8(1)	4,1±1,9
13	40(1)	80(1)	OS(-1)	1(-1)	1(-1)	3,4±0,6
14	40(1)	80(1)	OS(-1)	1(-1)	8(1)	3,2±3,1
15	40(1)	80(1)	EF(1)	8(1)	1(-1)	3,6±0,2
16	40(1)	80(1)	EF(1)	8(1)	8(1)	2,6±0,3
17**	32,5(0)	60(0)	OS + EF(0)	4,5(0)	4,5(0)	1,5±0,2

\*OS = óleo de soja; EF = efluente de frigorífico

\*\*média de três experimentos independentes

O crescimento microbiano foi medido indiretamente pelo teor de glicosamina nos sólidos e valores elevados de glicosamina no meio foram obtidos em condições que forneceram baixa atividade lipásica. Este comportamento pode estar relacionado às diferentes respostas fisiológicas do fungo quando este é submetido a diferentes

condições nutricionais, podendo haver um desvio metabólico para o crescimento em detrimento da produção de lipase. Além disso, este resultado pode estar também associado ao fato que um maior acúmulo de biomassa pode levar ao aumento de protease no meio, devido à lise celular, e conseqüentemente à queda da atividade lipásica, conforme já observado em meio submerso para *Penicillium restrictum* (Freire *et al.*, 1997b). No entanto, este efeito ainda necessita de maior investigação.

Tabela 4.3: Demais respostas obtidas no primeiro planejamento experimental, após 48h de fermentação utilizando hidrolisado de levedura como fonte suplementar de nitrogênio.

Ensaio	Atividade Proteásica (U/g)	Conc. Glicosamina (mg/g)	Umidade Residual (%)	$a_w$	pH
1	0,076±0,001	4,8±1,0	39,03±0,06	0,969±0,001	6,63±0,12
2	0,078±0,008	4,9±0,8	38,54±1,34	0,972±0,001	6,63±0,01
3	0,115±0,007	4,5±0,5	38,52±1,53	0,963±0,004	6,61±0,16
4	0,102±0,019	4,8±0,9	38,04±2,53	0,962±0,004	6,52±0,05
5	0,052±0,012	4,6±0,4	79,32±0,16	0,997±0,001	6,26±0,03
6	0,059±0,007	4,3±0,1	77,11±0,11	0,997±0,002	6,19±0,08
7	0,069±0,020	5,8±0,4	77,88±0,62	0,997±0,001	6,22±0,03
8	0,054±0,014	3,8±1,0	77,43±0,13	0,998±0,001	6,21±0,02
9	0,045±0,017	3,1±0,2	22,02±1,05	0,893±0,006	6,56±0,20
10	0,062±0,005	2,8±0,5	24,15±2,22	0,915±0,018	6,43±0,13
11	0,057±0,017	3,2±0,1	26,81±2,60	0,927±0,018	6,48±0,01
12	0,044±0,001	3,1±0,1	24,35±3,20	0,913±0,019	6,35±0,04
13	0,021±0,008	4,2±0,1	75,66±1,52	0,999±0,001	6,28±0,25
14	0,039±0,001	3,9±0,1	75,68±0,68	0,999±0,001	6,41±0,20
15	0,028±0,013	4,2±0,1	76,03±1,27	0,999±0,001	6,34±0,04
16	0,026±0,009	3,8±0,2	74,53±0,18	0,999±0,001	6,31±0,01
17**	0,465±0,326	5,6±0,7	56,61±0,97	0,981±0,002	7,66±0,08

\*\*Média de três experimentos independentes.

Como já observado no acompanhamento cinético de algumas condições mostrado anteriormente, a atividade proteásica se manteve baixa em todos os experimentos. Observou-se pouca variação com as diferentes condições experimentais testadas no planejamento, a não ser no ponto central onde se obteve o maior resultado de atividade desta enzima. O mesmo ocorre com o pH do meio

fermentado, que também apresentou baixa variação e a ocorrência do valor máximo (7,66) no ponto central. Conforme já discutido, o aumento da alcalinização do meio pode estar relacionado à proteólise, uma vez que a ação da protease libera aminoácidos, cuja desaminação leva ao aumento do pH do meio.

Para uma análise mais consistente dos resultados do primeiro planejamento, os dados foram tabulados e analisados utilizando o pacote Statistica, módulo de Planejamento de Experimentos (“Experimental design”). Um planejamento fracionário permite apenas a avaliação dos efeitos principais e estes são melhor visualizados através do Gráfico de Pareto, que apresenta a magnitude dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre as variáveis de resposta.

A Figura 4.7 apresenta o gráfico de Pareto para os resultados do primeiro planejamento, utilizando a atividade lipásica como variável de resposta. Pode-se observar que a umidade (e também a atividade de água) é a variável que mais influencia a produção de lipase, apresentando um efeito negativo significativo a 95% de confiança. Esta análise confirma as observações preliminares da Tabela 4.2 e demonstra que a produção de lipase é prejudicada quando se utilizam níveis elevados de umidade no processo fermentativo. Embora a presença da água seja uma necessidade para o microorganismo em diversas funções, conforme já discutido no item (2.1.3); o excesso de umidade pode causar a redução da porosidade do meio dificultando assim a penetração do oxigênio na torta. Além disso, o excesso de água dificulta ainda a remoção de calor do meio (Mitchell *et al.*, 2003b; Pandey, 2003). A temperatura, tipo de fonte de carbono e concentrações dos suplementos não apresentaram efeito significativo (nível de 95%) sobre a atividade lipásica, utilizando hidrolisado de levedura como fonte suplementar de nitrogênio, continuando a análise preliminar da Tabela 4.2.

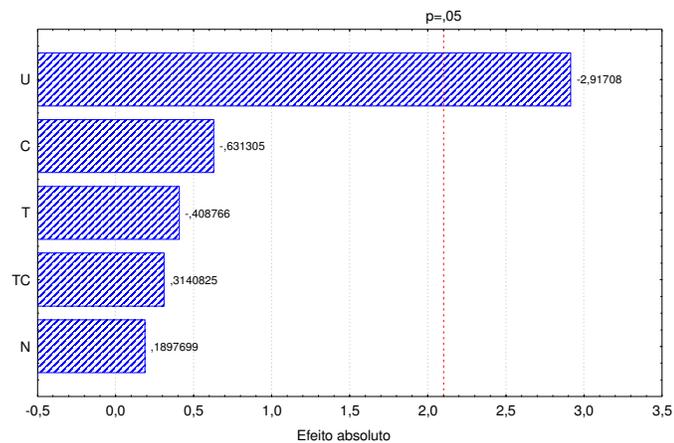


Figura 4.7: Efeito das variáveis manipuladas sobre a atividade lipásica utilizando hidrolisado de levedura como fonte suplementar de nitrogênio.

A análise estatística foi estendida considerando outras variáveis como resposta, como a atividade proteásica, concentração de glicosamina, umidade, e pH final da torta. Esta análise demonstrou que nenhuma das variáveis tem influência significativa (nível de 95% de confiança) sobre a atividade proteásica obtida. Este efeito pode ter ocorrido em função dos resultados de atividade proteásica terem sido extremamente baixos e ainda por não se ter conhecimento do tipo de protease produzido no processo. A temperatura apresentou efeito significativo (95%) sobre a concentração de glicosamina no meio, e conseqüentemente sobre o crescimento do fungo, provavelmente devido à aceleração do metabolismo do microorganismo. Esta variável também afeta significativamente a umidade residual e a atividade de água da torta, conforme o esperado.

O pH foi afetado significativamente apenas pelo conteúdo de água inicial do meio, sendo que nos experimentos conduzidos com menor teor de umidade notou-se um pequeno aumento do pH, no entanto este aumento foi bastante reduzido quando comparado ao obtido nos experimentos com alto teor de umidade inicial.

***Planejamento Fatorial utilizando água de maceração de milho como fonte suplementar de nitrogênio.***

A Tabela 4.4 apresenta os resultados obtidos no primeiro planejamento fatorial fracionário, utilizando água de maceração de milho como fonte suplementar de nitrogênio. A Tabela 4.5 apresenta outras respostas obtidas no primeiro planejamento experimental.

Utilizando esta fonte suplementar de nitrogênio foi possível se obter em média, maiores valores de atividade lipásica do que os obtidos com o hidrolisado de levedura. As condições experimentais que forneceram os maiores resultados foram as do experimento 2 e do ponto central. As condições do experimento 2 foram baseadas no menor nível de temperatura (25°C), umidade inicial (40%), óleo de soja como fonte suplementar de carbono em concentração 1% e 8% de AMM. Pode se observar que os resultados obtidos nos experimentos conduzidos utilizando a AMM como fonte de nitrogênio foram superiores aos obtidos quando se utilizou o HL. Este desempenho pode estar relacionado ao maior teor de gordura da AMM e/ou à presença de vitaminas ou outros componentes em sua composição, que estariam estimulando a produção da lipase. O HL pode ainda conter algum componente que estaria prejudicando a produção da enzima. Os menores valores para atividade lipásica também foram obtidos nos experimentos com 80% de umidade na torta, e alta concentração de suplementos.

Na maioria dos experimentos, a perda de umidade foi inferior a 5%, exceto para os experimentos 9 a 12, que foram realizados com baixa umidade inicial (40%) e alta temperatura (40°C), conforme o observado anteriormente para o planejamento utilizando HL. Neste caso também, nas condições de baixa umidade (~30%), apesar atividade de água do meio ainda está dentro da faixa considerada ótima para o crescimento de fungos (Farkas, 1997) mas também houve menor crescimento do fungo, como pode ser verificado pelo menor teor de glicosamina para estes experimentos.

Tabela 4.4: Matriz do planejamento experimental fracionário (valores reais e codificados) com as respostas da atividade lipásica após 48h de fermentação, utilizando água de maceração de milho como fonte suplementar de nitrogênio.

Ensaio	Temper. (°C)	Umidade (%)	Tipo de fonte de Carbono*	Concentração fonte de C (%)	Concentração fonte de N (%)	Atividade Lipásica (U/g)
1	25(-1)	40(-1)	OS(-1)	1(-1)	1(-1)	7,9±0,7
2	25(-1)	40(-1)	OS(-1)	1(-1)	8(1)	12,4±2,4
3	25(-1)	40(-1)	EF(1)	8(1)	1(-1)	7,0±0,8
4	25(-1)	40(-1)	EF (1)	8(1)	8(1)	5,4±0,8
5	25(-1)	80(1)	OS(-1)	8(1)	1(-1)	2,6±0,4
6	25(-1)	80(1)	OS(-1)	8(1)	8(1)	1,3±0,1
7	25(-1)	80(1)	EF (1)	1(-1)	1(-1)	1,6±0,3
8	25(-1)	80(1)	EF(1)	1(-1)	8(1)	3,2±0,5
9	40(1)	40(-1)	OS(-1)	8(1)	1(-1)	3,3±1,1
10	40(1)	40(-1)	OS(-1)	8(1)	8(1)	1,7±0,9
11	40(1)	40(-1)	EF(1)	1(-1)	1(-1)	3,6±0,1
12	40(1)	40(-1)	EF(1)	1(-1)	8(1)	4,6±0,1
13	40(1)	80(1)	OS(-1)	1(-1)	1(-1)	5,0±4,0
14	40(1)	80(1)	OS(-1)	1(-1)	8(1)	2,6±0,7
15	40(1)	80(1)	EF(1)	8(1)	1(-1)	1,8±1,0
16	40(1)	80(1)	EF(1)	8(1)	8(1)	4,2±1,5
17**	32,5(0)	60(0)	OS + EF(0)	4,5(0)	4,5(0)	10,2±1,5

\*OS = óleo de soja; EF = efluente de frigorífico

\*\*média de três experimentos independentes

Como nos casos já apresentados, a atividade proteásica também se manteve reduzida e apresentou pouca variação para todas as condições, apresentando valores maiores nas condições 1, 2, 3 e no ponto central. O mesmo comportamento pode ser observado para o pH.

Com a análise estatística dos efeitos das variáveis, que é apresentada sob a forma do gráfico de Pareto apresentado na Figura 4.8, constatou-se que aquela que apresenta maior influência na atividade da lipase continua sendo a umidade, desta vez, seguida pela temperatura, a concentração da fonte de carbono. Todas estas variáveis apresentaram efeitos negativos significativos (95%). O efeito negativo da umidade confirma o já observado pela análise preliminar da Tabela 4.4, onde se observou que os melhores resultados foram obtidos em menor nível de umidade, atribuído à dificuldade de transferência de massa e calor em altos níveis de umidade. O efeito negativo da temperatura pode estar relacionado ao fato de que uma maior temperatura leva à maior queda de umidade no meio, enquanto o efeito negativo da concentração de fonte de carbono pode ser relacionado com a inibição por excesso de substrato, como já observado por outros autores (Kamini *et al.*,

1998). As demais variáveis não apresentaram efeitos estatisticamente significativos em nível de 95% de confiança, conforme já observado nos experimentos com HL como suplemento.

Tabela 4.5: Demais respostas obtidas no primeiro planejamento experimental, após 48h de fermentação, utilizando água de maceração de milho (AMM) como fonte suplementar de nitrogênio.

Ensaio	Atividade Proteásica (U/g)	Conc. Glicosamina (mg/g)	Umidade Residual (%)	$a_w$	pH
1	0,455±0,049	5,2±0,6	37,90±0,39	0,945±0,001	6,37±0,04
2	0,310±0,001	4,1±0,5	37,27±0,31	0,939±0,001	6,26±0,03
3	0,385±0,007	4,9±0,4	38,59±1,21	0,946±0,003	6,59±0,05
4	0,175±0,007	4,9±0,1	37,49±0,06	0,939±0,001	6,27±0,05
5	0,053±0,031	4,9±0,1	79,29±0,85	0,982±0,001	6,39±0,02
6	0,049±0,049	5,4±0,2	77,44±0,40	0,983±0,001	5,93±0,04
7	0,021±0,001	4,3±0,6	79,51±0,05	0,985±0,001	6,36±0,03
8	0,013±0,006	4,8±0,3	79,09±1,23	0,984±0,001	5,93±0,01
9	0,090±0,025	3,9±0,8	31,09±1,21	0,946±0,005	6,73±0,03
10	0,027±0,004	2,8±0,2	32,30±0,71	0,938±0,001	6,31±0,04
11	0,101±0,013	3,9±0,1	34,97±0,09	0,956±0,002	6,55±0,01
12	0,052±0,001	3,0±0,2	32,46±1,12	0,937±0,006	6,30±0,03
13	0,006±0,001	3,2±0,3	76,60±0,21	0,999±0,001	6,66±0,01
14	0,004±0,004	3,0±0,1	75,11±0,01	0,999±0,001	6,24±0,01
15	0,062±0,059	3,4±0,1	77,88±1,01	0,999±0,001	7,02±0,02
16	0,034±0,027	3,5±0,6	77,05±0,35	0,999±0,001	6,64±0,45
17**	0,326±0,157	5,3±0,8	56,08±2,12	0,984±0,002	7,21±0,10

\*\*Média de três experimentos independentes.

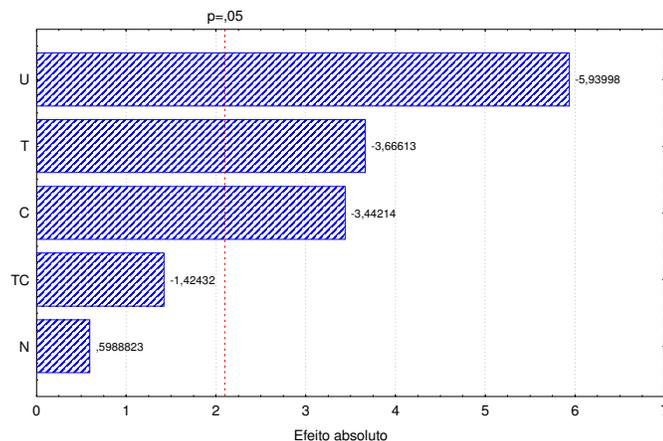


Figura 4.8: Efeito das variáveis manipuladas sobre a atividade lipásica utilizando água de maceração de milho como fonte suplementar de nitrogênio

Em uma avaliação global pode-se notar que a água de maceração de milho leva a uma maior produção de lipase, quando comparada aos experimentos utilizando hidrolisado de levedura. Pela Tabela 4.1 percebe-se que o teor de nitrogênio de ambas as fontes é praticamente o mesmo, e assim este resultado pode estar associado ao maior teor de gordura e outros nutrientes da AMM, que poderia induzir à maior produção de lipase.

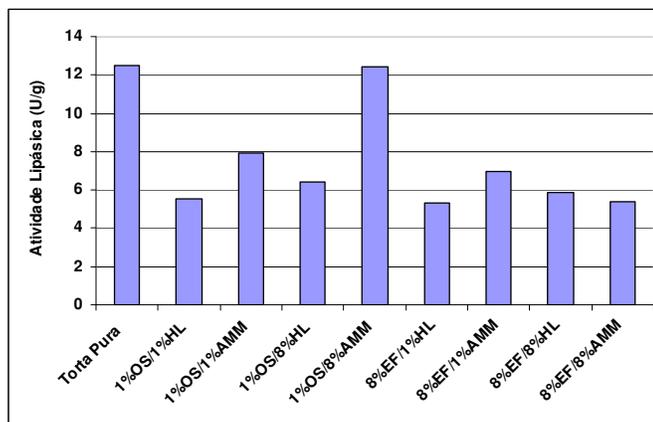


Figura 4.9: Comparação dos resultados da atividade lipásica utilizando a torta de soja pura e suplementações de óleo de soja e efluente de frigorífico como fonte de carbono, hidrolisado de levedura e água de maceração de milho como fonte de nitrogênio

A Figura 4.9 mostra um gráfico comparativo dos resultados obtidos de atividade lipásica em 48 horas de fermentação em diferentes condições suplementares de fonte de carbono e nitrogênio e utilizando a torta de soja pura.

Como conclusão parcial, pode-se considerar que a utilização de suplementações com o objetivo de aumentar o teor nutricional da torta de soja é desnecessária, sendo que estas em sua maioria causaram a inibição da produção de lipase, apresentando efeitos negativos sobre a atividade lipásica ou ainda estatisticamente não significativos. Portanto, pode-se considerar que a torta de soja consiste em um substrato já rico o suficiente em fonte de carbono e nitrogênio, dispensando a suplementação com outras fontes externas.

#### **4.4 Otimização da produção de lipase**

Com os resultados obtidos no primeiro planejamento, observou-se desnecessária a utilização de fontes suplementares de nutrientes na torta de soja. Assim, desenvolveu-se um novo planejamento de experimentos tendo como finalidade avaliar o efeito da temperatura e da umidade na produção de lipase por fermentação em estado sólido, maximizando a produção da enzima em função das condições operacionais. Este planejamento consistiu em um fatorial completo com os pontos axiais (Neto *et al*, 2002) para verificação dos efeitos de primeira e segunda ordem, bem como as interações entre as variáveis. As faixas de estudo foram ajustadas, em função dos resultados obtidos no primeiro planejamento. Nestes experimentos, além das amostras de 48 h de fermentação, foram coletadas amostras no tempo de 67 h, uma vez que durante a avaliação cinética preliminar observou-se que o máximo de produção de lipase se encontrava próximo a este ponto. As Tabelas 4.6 a 4.9 apresentam os resultados para o segundo planejamento fatorial nos tempos de 48 e 67 h, respectivamente.

Tabela 4.6: Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas da atividade lipásica, proteásica e glicosamina após 48h de fermentação

Ensaio	Temperatura (°C)	Umidade Inicial (%)	Atividade Lipásica (U/g)	Atividade Proteásica (U/g)	Conc. Glicosamina (mg/g)
1	18,6(-1)	37,3(-1)	3,7±1,0	0,164±0,039	3,0±0,3
2	36,4(1)	37,3(-1)	8,1±1,0	0,199±0,017	4,3±0,1
3	18,6(-1)	72,7(1)	1,0±0,4	0,165±0,072	3,4±0,2
4	36,4(1)	72,7(1)	2,1±0,2	0,159±0,013	5,7±0,3
5	15(-1,41)	55(0)	2,7±0,3	0,152±0,006	2,6±0,2
6	40(1,41)	55(0)	2,2±0,9	0,460±0,064	3,7±0,1
7	27,5(0)	30(-1,41)	9,2±0,4	0,218±0,006	4,2±0,7
8	27,5(0)	80(1,41)	4,4±0,4	0,134±0,016	5,0±0,7
9 <sup>a</sup>	27,5(0)	55(0)	12,5±0,9	0,210±0,008	7,2±0,2

<sup>a</sup>Experimento 9: ponto central realizado em triplicata.

Nas Tabelas 4.6 e 4.8 pode-se observar que a atividade lipásica máxima obtida nos dois tempos analisados ocorreu no ponto central ( $T=27,5^{\circ}\text{C}/U=55\%$ ), seguida da condição experimental 7 ( $T=27,5^{\circ}\text{C}/U=30\%$ ). Nota-se ainda que houve um pequeno aumento na atividade no tempo de 67 h. O mínimo obtido nos dois tempos foi encontrado na condição experimental 3 ( $T=18,6^{\circ}\text{C}/U=72\%$ ). Nota-se que o microorganismo tende a produzir mais lipase em menores níveis de umidade, conforme já observado nos resultados do primeiro planejamento.

Nestes experimentos não se notou uma relação clara do crescimento medido indiretamente pelo teor de glicosamina com a atividade lipásica. Observou-se uma correlação positiva entre as duas respostas, mas estatisticamente não significativa. O crescimento máximo se deu nas condições do ponto central, assim como a atividade lipásica. No entanto, o menor crescimento microbiano obtido foi utilizando a menor temperatura ( $15^{\circ}\text{C}$ ) combinada com 55% de umidade, provavelmente devido à baixa temperatura, entretanto esta não foi a condição onde se obteve menor atividade lipásica.

Tabela 4.7: Demais respostas obtidas no segundo planejamento experimental (48h de fermentação)

Ensaio	Umidade Residual (%)	$a_w$	pH
1	33,31±0,12	0,951±0,002	6,72±0,04
2	26,86±1,33	0,921±0,004	6,48±0,01
3	71,09±0,95	0,994±0,001	6,57±0,01
4	67,89±0,61	0,995±0,001	6,80±0,03
5	52,23±0,95	0,994±0,001	6,76±0,04
6	32,60±0,52	0,949±0,004	7,67±0,16
7	32,58±0,45	0,952±0,001	6,64±0,05
8	79,70±0,33	0,999±0,001	6,52±0,06
9 <sup>a</sup>	53,04±0,60	0,989±0,001	6,60±0,04

<sup>a</sup>Experimento 9: ponto central realizado em triplicata.

A atividade proteásica máxima para o tempo de 48 h ocorreu no experimento 6 (T=40°C/U=55%), seguido da condição 7 (T=27,5°C/U=30%). Para o tempo de 67 h, obteve-se o máximo no ponto central, seguido pelos experimentos 6 e 7. Não se observou também uma correlação significativa entre as atividades lipásica e proteásica. Os valores de atividade proteásica neste segundo planejamento foram visivelmente maiores que os obtidos anteriormente. É provável que a suplementação tenha também inibido ou retardado a produção desta enzima. No entanto, os níveis de protease obtidos ainda foram bem inferiores aos reportados na literatura para outros microorganismos (Maia *et al.*, 1999; Palma *et al.*, 2000; Leal *et al.*, 2003). O comportamento do pH seguiu a tendência da atividade proteásica, devido à liberação de aminoácidos e amônia ao meio.

Tabela 4.8: Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas da atividade lipásica após 67 h de fermentação

Ensaio	Temperatura (°C)	Umidade Inicial (%)	Atividade Lipásica (U/g)	Atividade Proteásica (U/g)	Conc. Glicosamina (mg/g)
1	18,6(-1)	37,3(-1)	3,0±0,4	0,142±0,001	3,7±0,7
2	36,4(1)	37,3(-1)	6,9±0,2	0,196±0,017	3,7±0,1
3	18,6(-1)	72,7(1)	1,4±0,1	0,138±0,002	4,6±0,2
4	36,4(1)	72,7(1)	5,7±0,3	0,194±0,068	11,0±0,3
5	15(-1,41)	55(0)	2,6±0,4	0,117±0,001	3,0±0,1
6	40(1,41)	55(0)	2,8±0,1	0,424±0,052	4,6±0,2
7	27,5(0)	30(-1,41)	10,4±1,4	0,374±0,017	4,8±0,1
8	27,5(0)	80(1,41)	5,5±0,9	0,159±0,007	8,2±1,0
9 <sup>a</sup>	27,5(0)	55(0)	15,6±1,5	0,446±0,037	10,3±0,2

<sup>a</sup>Experimento 9: ponto central realizado em triplicata.

Tabela 4.9. Demais respostas obtidas no segundo planejamento experimental (67 h de fermentação)

Experimento	Umidade Residual (%)	a <sub>w</sub>	pH
1	32,49±0,13	0,941±0,001	6,29±0,04
2	24,72±0,69	0,891±0,004	6,14±0,02
3	70,69±0,62	0,992±0,001	6,06±0,01
4	67,03±0,87	0,987±0,005	7,16±0,06
5	49,98±0,26	0,990±0,001	6,77±0,07
6	27,83±0,09	0,926±0,002	7,45±0,11
7	31,17±0,61	0,932±0,003	6,46±0,13
8	79,85±0,38	0,993±0,001	6,74±0,01
9 <sup>a</sup>	53,21±2,35	0,969±0,003	6,95±0,01

<sup>a</sup>Experimento 9: ponto central realizado em triplicata.

Analogamente à análise do primeiro planejamento, realizou-se a avaliação estatística dos resultados obtidos neste planejamento utilizando o pacote Statistica<sup>®</sup>. Com a análise estatística do planejamento completo foi possível se obter um modelo empírico para a atividade lipásica em função da temperatura e da umidade, para cada tempo de fermentação analisado. Os modelos codificados otimizados (Eq. 4.1

e 4.2) para a atividade lipásica foram validados pelas análises de variância (ANOVA), apresentadas nas Tabelas 4.10 e 4.11. Observa-se que os coeficientes de correlação obtidos (0,97 e 0,94, respectivamente) e o teste F (7,7 vezes maior que o  $F_{\text{tab}}$  para as atividades em 48 h de fermentação e 6,8 vezes para 67 h) foram válidos a 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 4.10.

$$AL48 = 12,534 - 5,279 \cdot T^2 - 1,959 \cdot U - 3,085 \cdot U^2 \quad (4.1)$$

onde,  
AL= atividade lipásica em 48h de fermentação  
T= temperatura  
U= umidade

Tabela 4.10: Análise de variância para atividade lipásica no tempo de 48 h

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Soma dos quadrados média	$F_{\text{calculado}}$
<b>Regressão</b>	201,36	3	67,12	33,7
<b>Resíduo</b>	13,94	7	1,99	
<b>Falta de ajuste</b>	12,43	5		
<b>Erro puro</b>	1,51	2		
<b>Total</b>	215,30	10		

$F_{\text{tab},3,7,95\%} = 4,35$   
 $r = 0,97$

$$AL67 = 15,634 - 6,756 \cdot T^2 - 4,105 \cdot U^2 \quad (4.2)$$

onde,  
AL= atividade lipásica em 67h de fermentação

Tabela 4.11: Análise de variância para atividade lipásica no tempo de 67 h

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Soma dos quadrados média	$F_{\text{calculado}}$
<b>Regressão</b>	283,63	2	141,82	30,49
<b>Resíduo</b>	37,20	8	4,65	
<b>Falta de ajuste</b>	32,58	6		
<b>Erro puro</b>	4,62	2		
<b>Total</b>	320,83	10		

$F_{\text{tab},2,8,95\%} = 4,46$   
 $r = 0,94$

As superfícies de resposta mostram que em ambos os casos o máximo de atividade lipásica se encontra em torno do ponto central o que determina a otimização da produção da enzima nas faixas estudadas ( $T=27,5^{\circ}\text{C}$  e  $U=55\%$ ), o que pode ser melhor observado nas curvas de contorno (Fig. 4.10b). A atividade máxima obtida pode alcançar cerca de 12,5 U/g de torta seca para 48 h de fermentação e 15,6 U/g para 67 h de fermentação. 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 o 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 (Pandey, 2003).

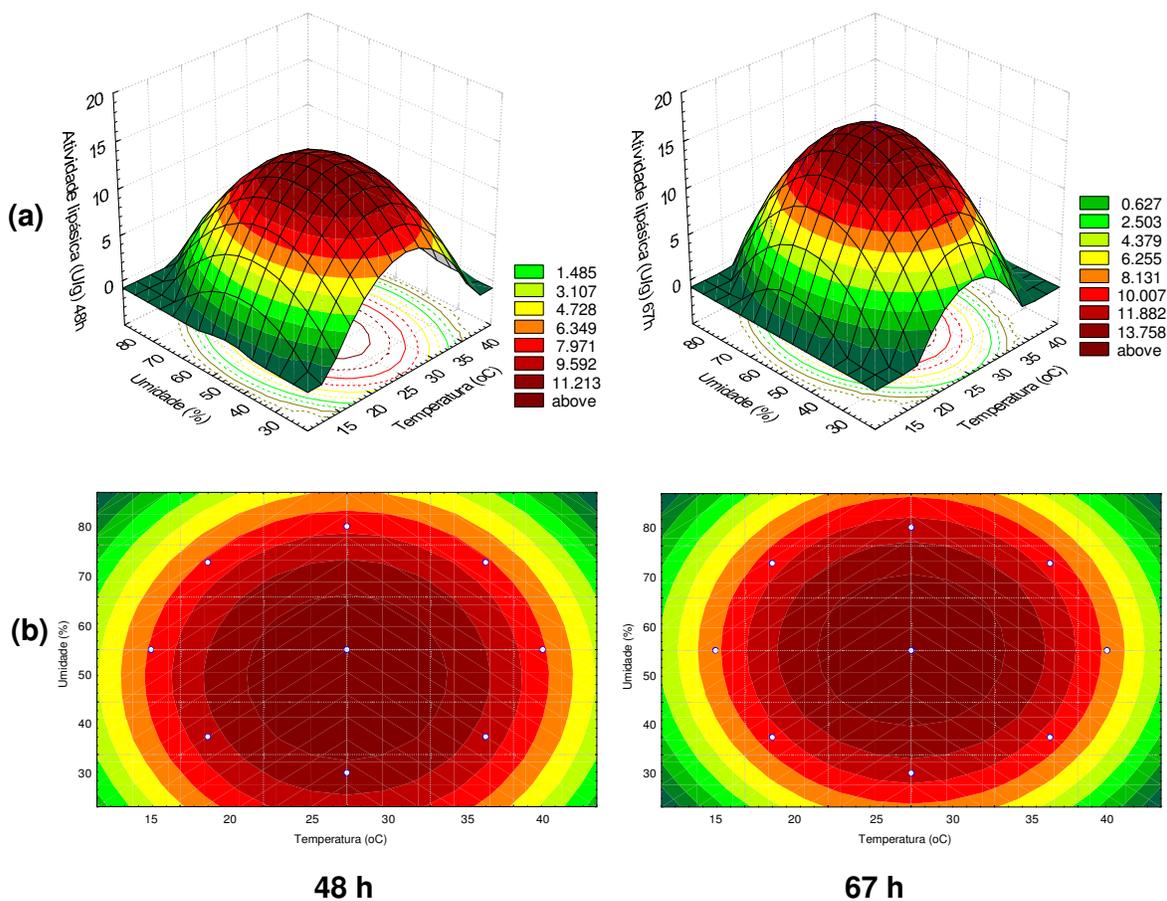


Figura 4.10: (a) Superfícies de resposta e (b) curvas de contorno para atividade lipásica

Os resultados de glicosamina também foram avaliados estatisticamente, obtendo-se os modelos codificados em função da temperatura e umidade apresentados nas equações 4.3 e 4.4. Estes foram validados pela análise de variância, apresentadas nas Tabelas 4.12 e 4.13. Os elevados coeficientes de correlação (0,96 e 0,98, respectivamente) e os valores de F calculado (6,9 e 4,5 vezes maior que o tabelado) validaram os modelos. Com os modelos codificados foi possível se obter as superfícies de resposta e curvas de contorno, apresentadas na Figura 4.11.

$$G48 = 0,653 \cdot T - 1,998 \cdot T^2 - 1,263 \cdot U^2 \quad (4.3)$$

onde,  
G= concentração de glicosamina em 48h de fermentação  
T= temperatura  
U= umidade

Tabela 4.12: Análise de variância para a concentração de glicosamina em 48 h

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Soma dos quadrados média	F <sub>calculado</sub>
<b>Regressão</b>	28,607	3	9,54	30,22
<b>Resíduo</b>	2,209	7	0,315	
<b>Falta de ajuste</b>	2,084	5		
<b>Erro puro</b>	0,125	2		
<b>Total</b>	30,816	10		

$F_{\text{tab}3,7,95\%} = 4,35$   
 $r = 0,96$

$$G67 = 1,085 \cdot T - 3,107 \cdot T^2 + 1,618 \cdot U - 1,736 \cdot U^2 + 1,6 \cdot T \cdot U \quad (4.4)$$

onde,  
G= concentração de glicosamina em 67h de fermentação

Tabela 4.13: Análise de variância para a concentração de glicosamina em 67 h

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Soma dos quadrados média	F <sub>calculado</sub>
<b>Regressão</b>	98,82	5	19,763	23,0
<b>Resíduo</b>	4,30	5	0,860	
<b>Falta de ajuste</b>	4,23	3	1,409	
<b>Erro puro</b>	0,07	2	0,036	
<b>Total</b>	103,12	10		

$F_{\text{tab}5,5,95\%} = 5,05$   
 $r = 0,98$

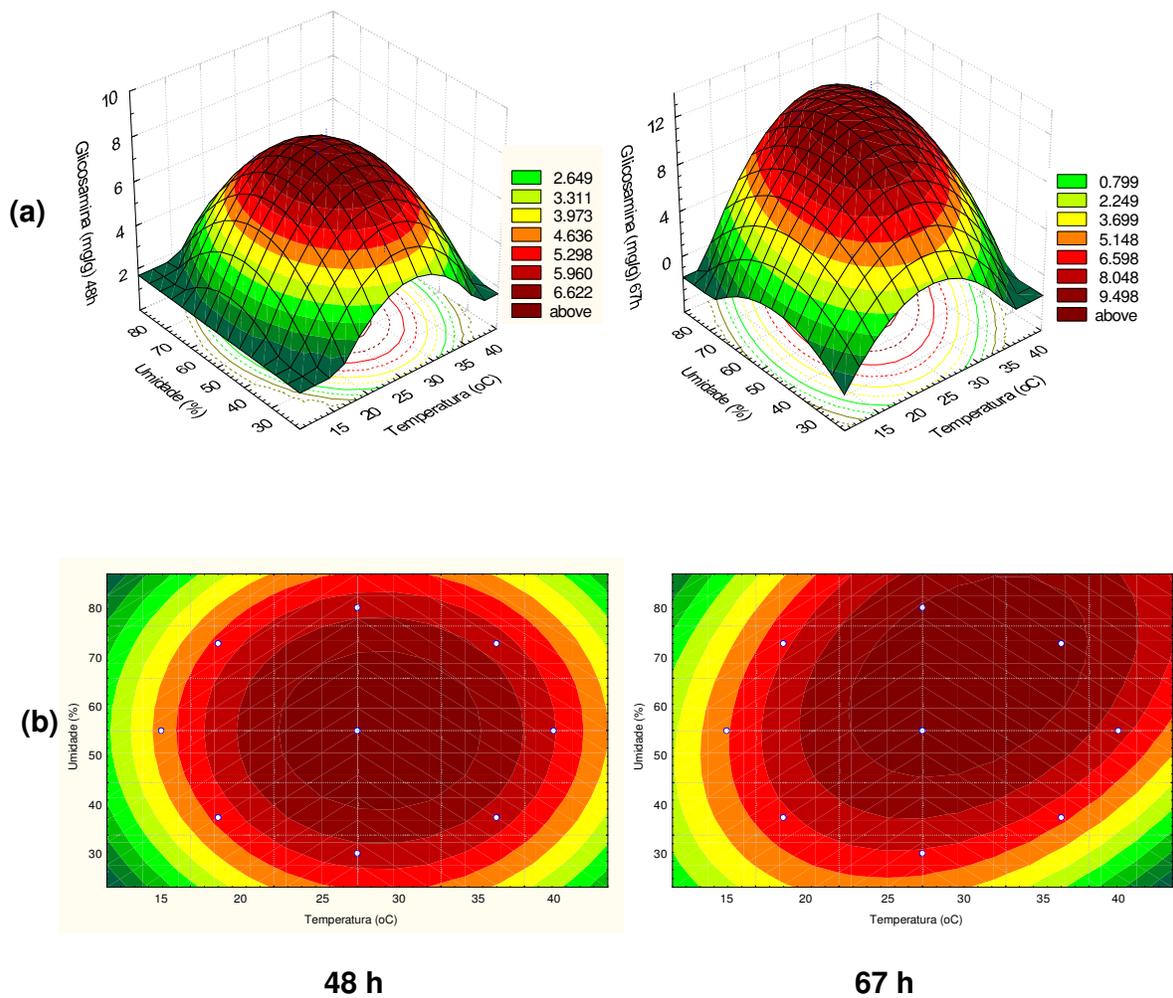


Figura 4.11: (a) Superfícies de resposta e (b) curvas de contorno para glicosamina

As curvas de contorno permitem observar que em ambos os casos o crescimento máximo se encontra na região do ponto central ( $T=27,5^{\circ}\text{C}$  e  $U=55\%$ ). Nota-se que as condições de crescimento máximo não são exatamente as mesmas das condições nas quais se obteve o máximo de atividade lipásica, mas concordam com o comportamento associado observado pela determinação da correlação entre as duas respostas. Estudos de FES com *A. niger* (Kamini, 1998) e *P. restrictum* (Freire *et al.*, 1997b) apresentam claramente esta associação na fermentação de torta de gergelim e de babaçu. Comportamento similar também tem sido observado em meio submerso (Miranda *et al.*, 1999; Maia *et al.*, 1999).

A análise estatística do crescimento mostra então que, assim como na atividade lipásica, extremos de temperatura e umidade tendem a reduzir o crescimento, pelas mesmas razões descritas anteriormente.

A análise estatística dos resultados de atividade proteásica permitiu somente a obtenção dos efeitos de primeira e segunda ordem da umidade e temperatura sobre esta resposta, uma vez que não foi possível se obter um modelo estatisticamente significativo. Os efeitos foram expressos na forma de gráficos de Pareto apresentados na Figura 4.12. É interessante observar que o comportamento em 67 h é distinto do comportamento em 48 h. Em ambos os casos, a temperatura apresenta efeito (linear) positivo, enquanto a umidade apresenta efeito negativo, embora, este não seja estatisticamente significativo para o tempo de 67 h.

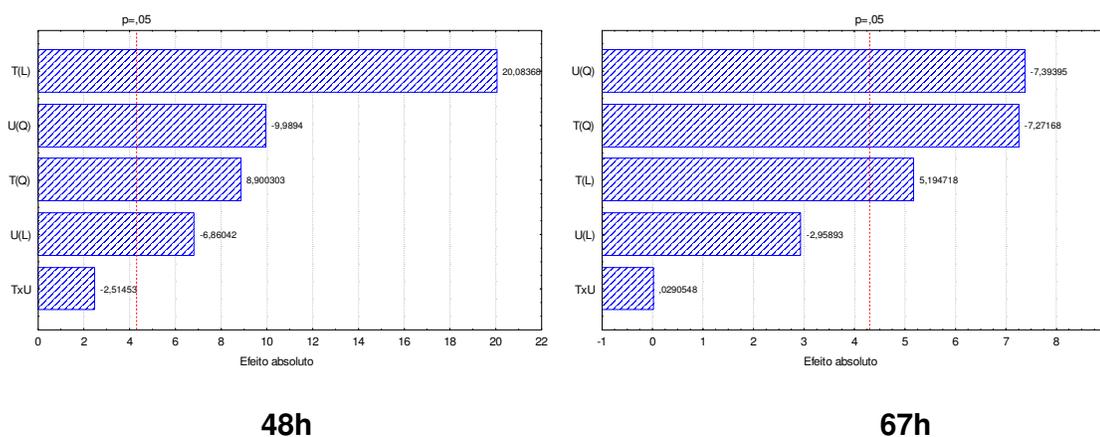


Figura 4.12: Efeitos das variáveis manipuladas sobre a atividade proteásica.

Como conclusão parcial dos experimentos e análise estatística do segundo planejamento, chegou-se à condição ótima para a produção de lipase em escala laboratorial por fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Penicillium simplicissimum*, dentro da faixa investigada.

#### 4.4.1 Cinética de fermentação para as condições otimizadas

A melhor condição para a produção da lipase por fermentação em estado sólido, determinada através da metodologia de análise de superfície de resposta, foi

a condição experimental do ponto central do segundo planejamento ( $T = 27,5 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $U = 55 \%$ ). Esta condição foi então realizada novamente para acompanhamento cinético.

A Figura 4.13 apresenta a cinética de crescimento, produção de lipase e protease para a condição otimizada. A atividade lipásica desta vez apresentou um pico de atividade máxima de cerca de 30 U/g, em torno de 80 horas de fermentação. Este valor é comparável aos obtidos por FES utilizando *P. restrictum* e torta de babaçu (Gombert, 1999), mas bem inferior do que os obtidos por FES de torta de gergelim e outros substratos utilizando *A. niger* (Kamini *et al.*, 1998). Neste gráfico pode-se também observar que ocorre um aumento da atividade de ambas as enzimas ao longo da fermentação. Após 80 h de fermentação há uma queda na atividade lipásica enquanto a proteásica permanece constante. Como já relatado anteriormente, a queda da atividade lipásica ocorre provavelmente devido à inativação pela ação da protease, ou ainda à desativação pelo aumento do pH do meio pela ação da protease.

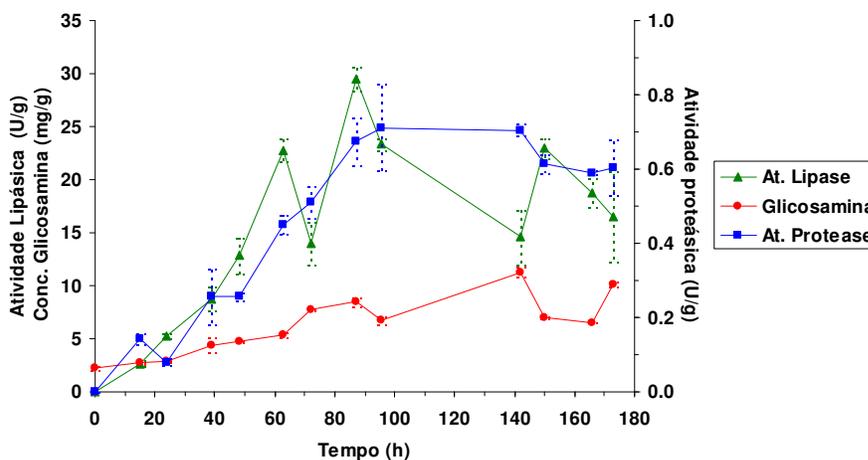


Figura 4.13: Cinética de crescimento (glicosamina), produção de lipase e protease da condição experimental ótima

Nestas curvas cinéticas pode-se notar com clareza a associação do crescimento com a produção de lipase, conforme o observado por Kamini *et al.* (1998), e ainda com a produção de protease. A determinação das correlações entre estas variáveis de resposta, considerando-se apenas os valores até o ponto de

máxima atividade lipásica ( $r = 0,70$  e  $r = 0,90$ , respectivamente), confirma o observado visualmente.

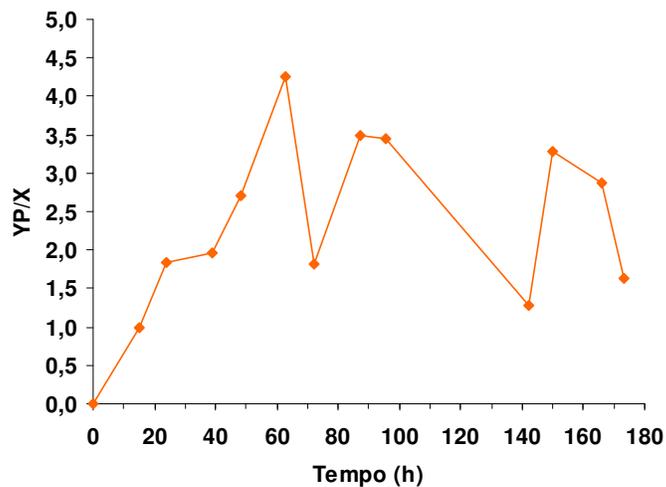


Figura 4.14: Evolução do rendimento no decorrer da fermentação

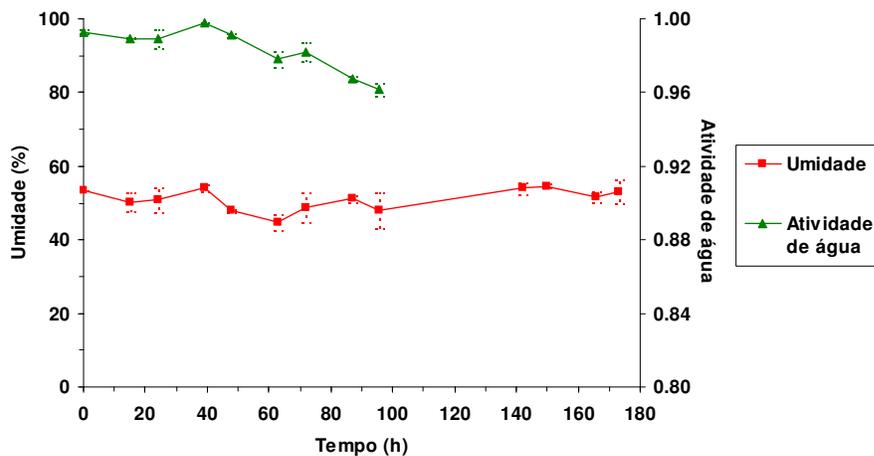


Figura 4.15: Evolução da umidade e atividade de água do meio como tempo de fermentação<sup>5</sup>.

<sup>5</sup> Dados de atividade de água disponíveis somente para as primeiras 100 h de fermentação.

A Figura 4.14 mostra a evolução do rendimento da produção de lipase no decorrer da fermentação, onde se pode observar que a máxima produtividade foi obtida em torno de 63 horas de fermentação.

A Figura 4.15 apresenta a evolução da umidade e da atividade de água ao longo da fermentação. Nota-se que o meio manteve a umidade no nível estabelecido, havendo somente uma pequena queda na atividade de água.

A evolução do pH durante a fermentação pode ser acompanhada através da Figura 4.16. Observa-se que o pH apresenta o mesmo comportamento que a atividade proteásica, embora o aumento do pH seja bem pequeno quando comparado com outros trabalhos em FES, assim como o observado para a atividade proteásica (Gombert *et al.*, 1999, Palma *et al.*, 2000; Kamini *et al.*, 1998; Capra *et al.*, 2003; Dominguez *et al.*, 2003), sugerindo que a proteólise neste caso é inferior ao observado por outros autores.

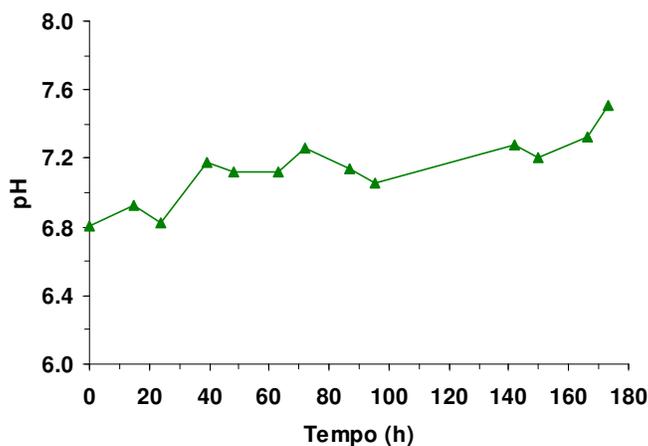


Figura 4.16: Evolução do pH ao longo do tempo de fermentação

#### 4.5 Biorreator com agitação intermitente

Nos experimentos com o biorreator, optou-se por manter a temperatura fixa em 27,5 °C, que foi a temperatura ótima para a produção de lipases encontrada através do segundo planejamento. As variáveis estudadas neste planejamento foram o teor

de umidade da torta e a vazão de ar injetada no leito. A matriz do planejamento de experimentos com os valores reais e codificados utilizados nesta etapa, juntamente com os resultados de atividade lipásica é apresentada na Tabela 4.14. As respostas de atividade proteásica, glicosamina, umidade e pH estão apresentadas nas Tabelas 4.15 e 4.16.

Tabela 4.14: Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas da atividade lipásica após 48 e 72 h de fermentação para experimentos em biorreator com agitação intermitente

Ensaio	Umidade (%)	Vazão (L/min)	Atividade lipásica (48h)	Atividade lipásica (72h)
1	40(-1)	1(-1)	18,2±0,3	32,8±1,1
2	60(1)	1(-1)	5,4±0,9	7,7±0,2
3	40(-1)	8(1)	9,9±0,3	12,6±0,3
4	60(1)	8(1)	10,0±0,4	22,7±0,7
5*	50(0)	4,5(0)	14,8±0,3	21,3±1,1

\*Ponto central em duplicata.

Tabela 4.15: Demais respostas obtidas no terceiro planejamento experimental após 48 e 72 h de fermentação, para experimentos em biorreator com agitação intermitente

Ensaio	At. proteásica (U/g)		Glicosamina (U/g)	
	48 h	72 h	48 h	72 h
1	0.521±0,003	0.494±0,001	1,7±0,2	1,6±0,2
2	0.538±0,006	0.545±0,007	4,5±0,1	3,4±0,1
3	0.202±0,002	0.189±0,013	2,7±0,4	2,2±0,6
4	0.589±0,003	0.558±0,001	2,7±0,4	3,1±0,2
5*	0,419±0,003	0,339±0,004	3,1±0,2	3,1±0,1

\*Ponto central em duplicata.

Tabela 4.16: Demais respostas obtidas no terceiro planejamento experimental após 48 e 72 h de fermentação, para experimentos em biorreator com agitação intermitente

Ensaio	Umidade residual (%)		pH	
	48 h	72 h	48 h	72 h
1	31.48±0,21	25.58±0,27	7.43	7.12
2	54.04±0,89	33.49±1,53	8.34	8.59
3	10.00±0,59	10.65±0,14	6.55	6.45
4	23.68±1,00	12.10±0,24	7.87	7.62
5*	24,40±0,30	12,43±0,08	6,68±0,03	6,57±0,07

\*Ponto central em duplicata.

Uma adversidade observada nos experimentos com o biorreator foi a formação de gradientes de temperatura no leito no decorrer do processo. Após 48 h de fermentação, o fundo do leito se apresentava mais quente do que a parte central e o

topo. Este comportamento também tem sido descrito na literatura. Este pode ser atribuído a uma combinação de efeitos. A maior parte do calor do leite é eliminada por convecção e por evaporação da água. Devido à maior intensidade de aeração no fundo do leito, há a maior geração de calor metabólico, que se acumula no fundo do reator, devido à baixa condutividade térmica do leite. Com a secagem do leite ao longo da fermentação, a transferência de calor é ainda mais prejudicada, havendo então a formação de gradientes de temperatura (Sangsurasak e Mitchell, 1998; Palma *et al.*, 2002; Durand, 2003).

Outro problema encontrado foi a redução do volume do leite devido ao crescimento do micélio e perda de umidade, o que pode levar à redução da transferência de oxigênio no processo, bem como a criação de caminhos preferenciais no leite (Durand, 2003). Para minimizar este problema o leite foi revolvido diariamente, antes da retirada de amostras para análise.

A cinética de produção de lipase para todos os ensaios pode ser observada na Figura 4.17. O pico de atividade lipásica (33 U/g) foi obtido em 72 horas de fermentação, utilizando 40% de umidade inicial e uma vazão de ar de 1 L/min. Este resultado reproduz o resultado encontrado no ponto ótimo na fermentação realizada em béqueres, sendo que o máximo no biorreator foi obtido em um menor tempo, representando uma maior produtividade (0,458 U/g.h contra 0,375 U/g.h).

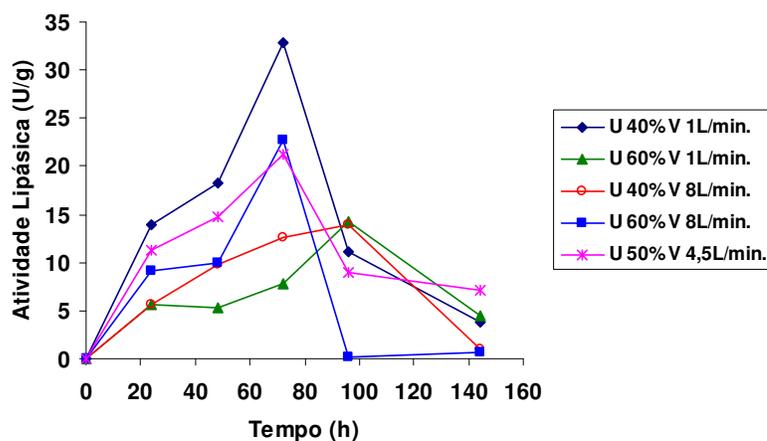


Figura 4.17: Cinéticas de produção de lipase em biorreator de agitação intermitente.

Uma vazão de ar menor, associada a um baixo teor de umidade inicial, favoreceu a produção de lipase. A baixa vazão de ar utilizada no experimento 1, pode ter retardado o processo de perda de umidade, propiciando melhores condições para a produção de lipase. Observa-se que de fato esta condição foi a que propiciou a menor perda de umidade durante a fermentação, apesar de ser a condição com o menor teor de umidade inicial. O ensaio 2, realizado com mesma vazão de ar, mas umidade inicial maior, apresentou maior perda de umidade, maior crescimento, maior produção de protease e, conseqüentemente, menor produção de lipase (Tabelas 4.14, 4.15 e 4.16). A baixa produção de lipase neste caso, pode estar relacionada tanto ao efeito da redução da transferência de massa e calor em umidades maiores, ou ainda à queda brusca da umidade após 72 horas de fermentação. Com a queda da umidade do sistema, a produção de lipase é inviabilizada devido à lise celular ou à quantidade de água insuficiente para a manutenção da atividade celular. A quebra das hifas do microorganismo durante a agitação do meio pode ainda ter modificado seu comportamento fisiológico.

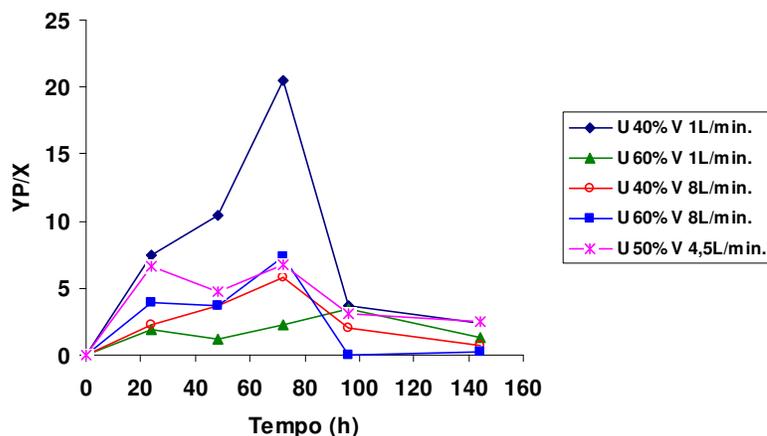


Figura 4.18: Rendimento em biorreator de agitação intermitente.

A Figura 4.18 mostra a evolução do rendimento em produção de lipase para os experimentos utilizando o biorreator com agitação intermitente. Pode-se observar que o rendimento máximo foi obtido na condição a 40 % de umidade e uma vazão de ar de 1 L/minuto em 72 horas de fermentação. Após este tempo de fermentação

nota-se uma queda acentuada na atividade lipásica em todos os ensaios, sugerindo que após este período de fermentação ocorre a secagem do leite prejudicando a produção de lipase em todas as condições estudadas.

Ao contrário dos experimentos anteriores, nos experimentos com biorreator não foi possível identificar uma associação da produção de lipase com o crescimento microbiano, conforme pode ser observado nas Tabelas 4.14 a 4.15. Na verdade, nota-se uma tendência inversa, ou seja, uma condição que resulta em baixa concentração de glicosamina favoreceu um alto rendimento em lipase e vice-versa, sugerindo que a produção de lipase neste caso se dá em detrimento do crescimento. Estudos em fermentação submersa mostram que a maior disponibilidade de oxigênio leva a maior crescimento e assim a maior concentração de protease no meio, devido à lise celular (Freire *et al.*, 1997b). No entanto este comportamento ainda deve ser melhor investigado.

A condição experimental que forneceu menor atividade proteásica não foi a que se obteve maior atividade lipásica, como pode ser observado através das Tabelas 4.14 a 4.15 e Figuras 4.17 e 4.19. Provavelmente nesta condição ( $U=40\%$   $V=8L/min$ ) houve rápida secagem do leite, como pode ser observado na Figura 4.20, o que pode ter prejudicado a produção de ambas as enzimas. Deve-se ainda considerar que com a queda da umidade observou-se um aumento no pH o que pode ter prejudicado a produção da lipase.

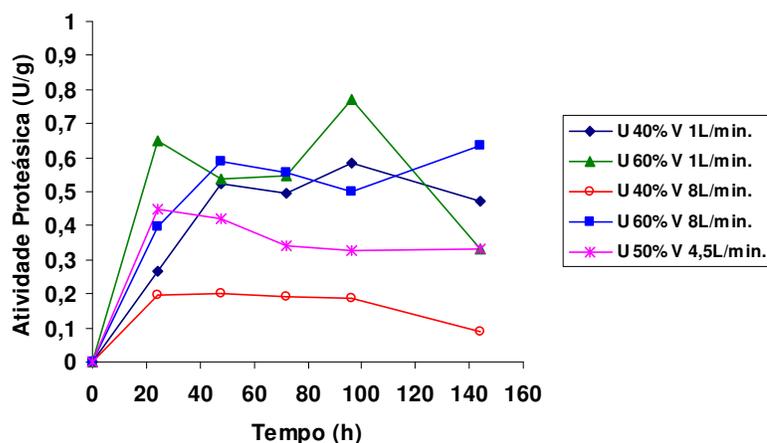


Figura 4.19: Cinéticas de produção de protease em biorreator de agitação intermitente.

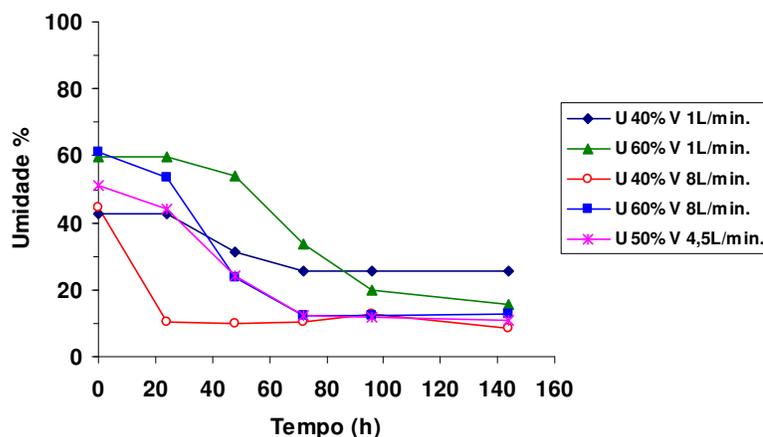


Figura 4.20: Evolução da umidade da torta ao longo do tempo para os experimentos em biorreator

Observa-se também através da Tabela 4.15 e Figura 4.21 que o crescimento do microorganismo no biorreator foi, em média, menor que o obtido nos demais planejamentos e na condição otimizada (Tabelas 4.6 e 4.8).

A atividade proteásica apresentou uma correlação positiva com o pH, em todos os experimentos, como já havia sido observado anteriormente neste trabalho e por outros autores (Gombert *et al.*, 1999; Maia *et al.*, 1999). Contudo deve-se ressaltar que nem sempre o aumento do pH está relacionado à proteólise. Nos ensaios com o biorreator observa-se uma relação maior entre a umidade do sistema e o pH, sendo que o aumento do pH do meio (Figura 4.22) ocorre após a queda da umidade. Nestes experimentos, ao contrário do que ocorreu nos outros planejamentos, um pH acima de 8,0 foi obtido nas condições (ensaio 2) de alta umidade e baixa vazão de ar, onde também se obteve máxima atividade proteásica. Na maior parte dos experimentos, com exceção do ponto central, obteve-se uma elevada correlação positiva entre atividade proteásica e concentração de glicosamina, mostrando que a produção desta enzima está associada ao crescimento.

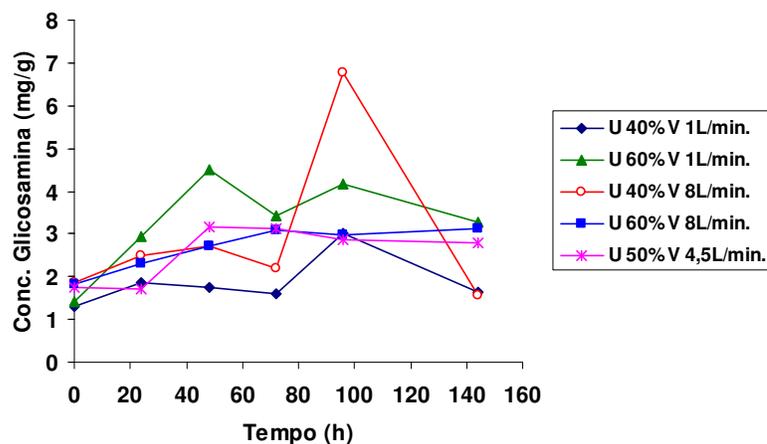


Figura 4.21: Cinética de crescimento para experimentos em biorreator de leito fixo

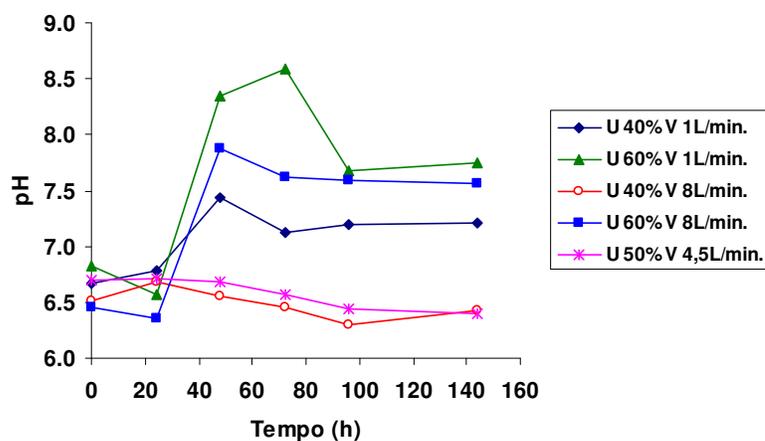


Figura 4.22: Evolução do pH ao longo do tempo para os experimentos em biorreator

A análise estatística dos resultados deste planejamento foi realizada da mesma forma que as anteriores, para os dois tempos de fermentação selecionados (48 e 72h). No entanto, não foi possível se validar modelos de primeira ordem para nenhuma das variáveis de resposta em ambos os casos. Portanto, são apresentadas na Figura 4.23 os efeitos dos parâmetros e suas interações sobre as respostas apenas para o tempo de 48 h, uma vez que os mesmos comportamentos foram obtidos para os dois tempos de fermentação. Para a otimização das condições experimentais da FES em biorreator, deveria se montar um novo planejamento experimental, deslocando-se as faixas de estudo em função dos resultados dos

efeitos de primeira ordem. Deve-se ainda acrescentar os pontos axiais para avaliação dos efeitos de segunda ordem, no tratamento estatístico dos resultados foi possível verificar que os efeitos de curvatura são relevantes neste caso.

A análise dos gráficos de Pareto mostra que ambas a umidade e vazão de ar afetam significativamente (95%) a atividade lipásica e proteásica, além da umidade e pH. O crescimento microbiano não foi afetado significativamente por nenhuma das duas variáveis manipuladas.

A vazão de ar isoladamente não apresentou efeito significativo sobre a atividade lipásica, enquanto a interação entre a vazão de ar e umidade apresentou forte efeito positivo. A umidade isoladamente exerce um forte efeito negativo na produção de lipase. Estes resultados podem ser relacionados com a rápida redução da umidade em maiores vazões de ar, conforme foi observado na Figura 4.20, que levaria a níveis de umidade abaixo do necessário para se manter as funções metabólicas do microorganismo. Teores de umidade mais elevados mostram aqui, novamente, que são prejudiciais à produção de lipase, possivelmente devido à diminuição da porosidade do meio e da eficiência de transferência de massa e calor. Este efeito pode ser consequência do aumento da atividade proteásica, uma vez que, ao contrário do que ocorre com a atividade lipásica, observa-se que a umidade apresenta um efeito fortemente positivo sobre a atividade proteásica. A vazão de ar, por sua vez, tem efeito negativo significativo sobre a produção de protease, provavelmente devido à secagem do leite. Este comportamento se repete quando se analisa o pH final do meio, devido à alta correlação entre estas duas variáveis, como já comentado anteriormente. Através dos resultados é possível observar que a vazão de ar reduz a umidade do leite prejudicando a produção da lipase.

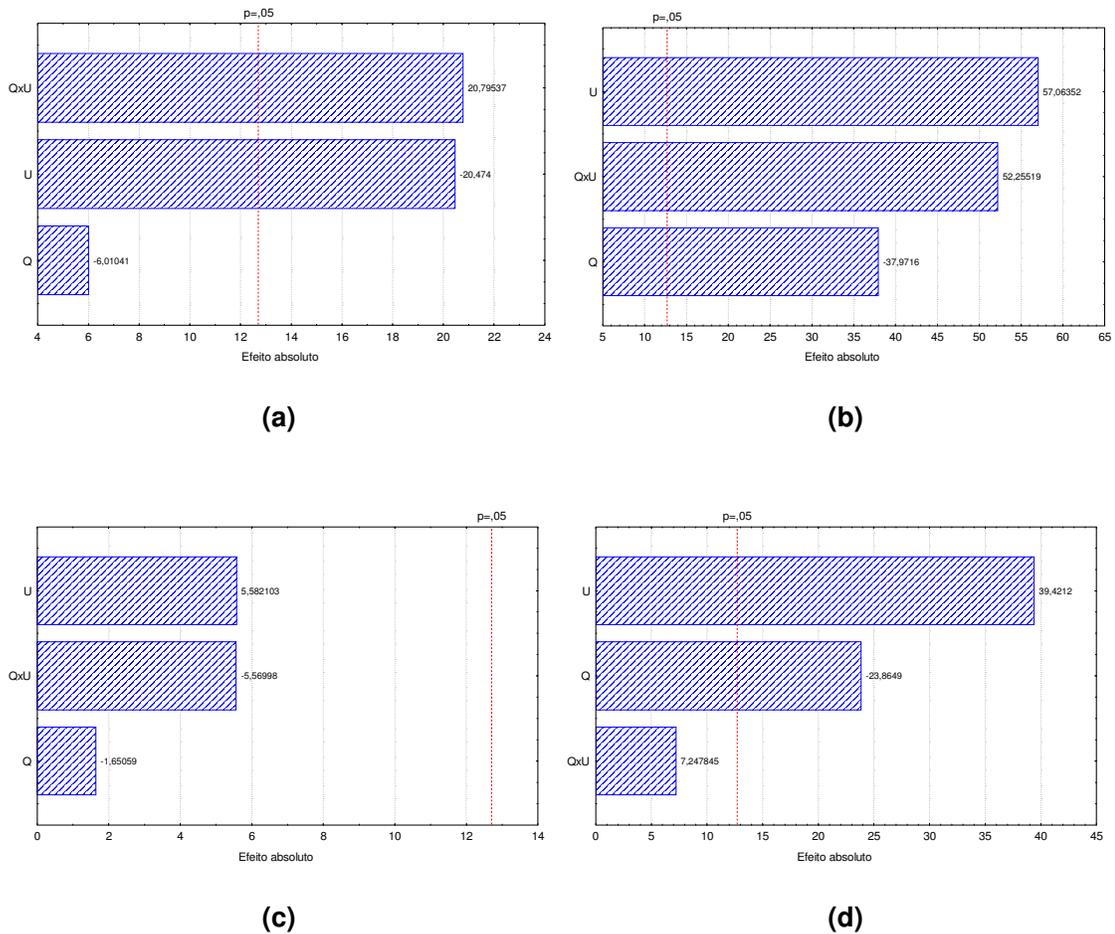


Figura 4.23: Efeitos das variáveis manipuladas sobre (t=48h): (a) atividade lipásica; (b) atividade proteásica; (c) crescimento microbiano (glicosamina); (d) pH

Através da análise destes resultados, observou-se que os experimentos em biorreatores conduzidos em níveis de umidade maior dificultam a síntese da lipase. Desta forma, a associação entre um teor de umidade baixo e uma vazão de ar baixa, direcionou o metabolismo do fungo para a produção da lipase, sendo que o oposto ocorreu quando se utilizou uma umidade elevada e uma vazão de ar elevada.

## **CONCLUSÕES E SUGESTÕES**

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1 Conclusões

A utilização de fermentação em estado sólido na produção de lipase utilizando como substrato a torta de soja apresentou resultados satisfatórios. O fungo *Penicillium simplicissimum* apresentou um bom desempenho na produção da enzima, permitindo se obter altos valores de atividade lipásica (30 a 33 U/g) nas condições operacionais otimizadas ( $T=27,5^{\circ}\text{C}$ ,  $U=55\%$ ) e no biorreator. Além disso obteve-se baixa atividade proteásica, quando comparado a outros microorganismos e meios reportados na literatura, o que torna vantajoso a utilização deste sistema para a produção de lipases.

A torta de soja demonstrou ter um grande potencial nutricional, possibilitando o bom desenvolvimento do microorganismo tanto em termos de crescimento quanto em produção de lipase, uma vez que os resultados obtidos neste trabalho mostraram não haver a necessidade de utilização de fontes suplementares de carbono e nitrogênio, o que pode levar a uma considerável economia com matérias-primas no processo industrial.

### 5.2 Sugestões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, observa-se que ainda existem muitos pontos a serem explorados a respeito deste sistema de fermentação, como:

- A continuidade dos experimentos com o biorreator de agitação intermitente, buscando otimizar o processo para a produção de lipase, bem como procurar alternativas capazes minimizar os problemas de transferência de calor e massa no interior do biorreator;
- A utilização das técnicas de dosagem do crescimento microbiano, com utilização de métodos respirométricos, para uma avaliação mais precisa

do crescimento e verificação da associação da produção da enzima com o crescimento microbiano;

- O desenvolvimento de técnicas de dosagem de substratos metabolizáveis pelo microorganismo, visando relacionar o consumo de substrato com a produção da lipase;
- O desenvolvimento de modelos matemáticos semi-empíricos e estimação de parâmetros utilizando os dados de consumo de substrato, crescimento e produção de lipase;
- Caracterização e purificação da(s) lipase(s) produzida(s) pelo fungo nas condições operacionais investigadas neste trabalho;
- O prosseguimento dos estudos utilizando a torta de soja como substrato, para a produção de lipase e outras enzimas utilizando outros microorganismos;
- A realização de estudos com outros tipos e configurações de biorreator (p.ex.: tambor rotativo) utilizando torta de soja como substrato e *P. simplicissimum* ou outros microrganismos para a produção de lipases.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-FATTAH, Y.R., OLAMA, Z.A. L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. *Process Biochem.*, v. 38, p. 115-122, 2002.
- ADAMS, T.T., EITEMAN, M.A., HANEL, B.M. Solid-state fermentation of broiler litter for production of biocontrol agents. *Biores. Technol.*, v. 82, p. 33-41, 2002.
- AIDOO, K.E., HENDRY, R., WOOD, B.J.B. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *Appl. Microb. Biotechnol.*, v. 12, p. 6-9, 1981.
- BELARBI, E.H., MOLINA, E., CHISTI, Y. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enz. and Microb. Technol.*, v. 26, p. 516-529, 2000.
- BENNETT, J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J. of Biotechnol.*, v. 66, p. 101-107, 1998.
- BENJAMIN, S., PANDEY, A., Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Braz. Arch. of Biol. and Technol.*, v. 44, p. 213-221, 2001.
- BERTOLIN, T.E., COSTA, J.A.V., PASQUALI, G.D.L. Glucoamylase production in batch and fed-batch solid state fermentation: effect of maltose or starch addition. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v.11, p.13-16, 2001.
- BIANCHI, V.L.D., MORAES, I.O., CAPALBO, D.M.F. *Fermentação em estado sólido, Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*, 1ª edição, Ed. Edgard Blücher Ltda, 2001, v. 2, p. 247-276.
- BRAMORSKI, A., SOCCOL, C.R., CHRISTEN, P., REVAH, S. Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agro-industrial wastes. *Rev. Microbiol.*, v. 29, p. 1-8, 1998.

- BRAND, D., PANDEY, A., ROUSSOS, S., SOCCOL, C.R. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enz. and Microbial Technol.*, v. 27, p. 127-133, 2000.
- NETO, B.B.; BRUNS, R.E, SCAMINIO, I.S., *Como fazer experimentos*. 2ª edição. Campinas, SP: Ed. UNICAMP, 2002.
- CAMARERO, S., MARTINEZ, M.J., MARTINEZ, A.T. *Lignin-degrading enzymes produced by Pleurotus species during solid state fermentation of wheat straw*. in: Roussos, E.S., Lonsane, B.K., Raimbault, M., Viniegra-Gonzalez, G. (eds.) Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Solid State Fermentation (FMS95 Montpellier, França), Kluwer Academic Publishers, 1997, Londres.
- CAMMAROTA, M.C., TEIXEIRA, G.A., FREIRE, D.M.G. Enzimatic pré-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents. *Biotechnol. Letters*, v.23, p. 1591-1595, 2001.
- CAPRA, F., RIBEIRO, N.P., VARGAS, G.D.L.P., OLIVEIRA, D., FREIRE, D.M.G., DI LUCCIO, M. Efeito da umidade, temperatura e suplementação do meio na produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato. CD-Rom. Simpósio Internacional de Fermentações - SINAFERM, Florianópolis, SC, 2003.
- CASTILHO, L.R. Comunicação pessoal, 2003.
- CASTILHO, L.R., POLATO, C.M.S., BARUQUE, E.A., SANT'ANNA Jr., G.L., FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochem. Eng. J.*, v. 4, p. 239-247 , 2000.
- CHARNEY, J.E., TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.*, v. 171, p. 501-505, 1947.

- CHRISTEN, P., ANGELES, N. FARRES, A. E REVAH, S. *Lipase production by Rhizopus delemar grown on a synthetic support in solid state fermentation.* in: Roussos, E.S., Lonsane, B.K., Raimbault, M., Viniegra-Gonzalez, G. (eds.) Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Solid State Fermentation (FMS95 Montpellier, França), Kluwer Academic Publishers, 1997, Londres.
- CORDOVA, J., NEMMAOUI, M., ISMAILI-ALAOUI, M., MORIN, A., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M., BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *J. of Molec. Catal. B: Enzymatic*, v. 5, p.75–78, 1998.
- CORZO, G., REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Biores. Technol.*, v. 70, p. 173-180, 1999.
- COURI, S., TERZI, S.C., PINTO, G.A.S., FREITAS, S.P., COSTA, A.C.A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. *Process Biochem.*, v. 36, p. 255-261, 2000.
- DOMÍNGUEZ, A., COSTAS, M., LONGO, M.A., SANROMÁN, A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotech. Letters*, v. 25, p. 1225-1229, 2003.
- DUCRET, A., TRANI, M., LORTIE, R. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity. *Enz. and Microbial Technol.*, v. 22, p. 212-216, 1998.
- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 113-125 , 2003.
- DURAND, A, VERGOIGNAN, C. e DESGRANGES, C. *Biomass estimation in solid state fermentation*, in: Roussos, E.S., Lonsane, B.K., Raimbault, M., Viniegra-Gonzalez, G. (eds.) Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Solid State Fermentation (FMS95 Montpellier, França), Kluwer Academic Publishers, 1997, Londres.

- ELIBOL, M., OZER, D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem.*, v. 38, p. 367-372, 2002.
- ELIBOL, M., OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem.*, v. 36, p. 325-329, 2000.
- ESSAMRI, M., DEYRIS, V., COMEAU, L. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. *J. of Biotechnol.*, v. 60, p. 97-103, 1998.
- FARKAS, J. Physical methods of food preservation, in: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J., ed. *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, ASM Press, Washington D.C., 1997, p. 497-519, USA.
- FERRER, M., PLOU, F.J., NUERO, O.M., REYES, F., BALLESTEROS, A. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. *J. of Chem. Technol. and Biotechnol.*, v. 75, p. 569-576, 2000.
- FREIRE, D.M.G. *Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por Penicillium restrictum*. Rio de Janeiro: 1996. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica, IQ/UFRJ.
- FREIRE, D.M.G., GOMES, P.M., BON, E.P.S., SANT'ANNA Jr., G. Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*. *Rev. de Microbiol.*, v. 28, p. 6-12, 1997a.
- FREIRE, D.M.G., TELES, E.M.F., BON, E.P.S., SANT'ANNA Jr., G.L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, v. 63-65, p. 409-421, 1997b.
- FREIRE, D.M.G., CASTILHO, L.R. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. *Rev. Bras. Farm.*, v.81, p.48-56, 2000.

- FUNGARO, M.H.P., MACCHERONI Jr., *Recursos genéticos e melhoramento – Melhoramento genético para a produção de enzimas aplicadas à indústria de alimentos*. 1ª impressão, Embrapa, São Paulo: 2002, p. 427-453.
- GANDHI, N.N. Applications of lipase. *JAOCS*, v. 74, p. 621-634, 1997.
- GERMANO, S. *Desenvolvimento de bioprocessos para a produção, caracterização e purificação de proteases de Penicillium sp, por fermentação no estado sólido*. Curitiba: 2000. Tese de Doutorado. Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, UFPR.
- GERMANO, S., PANDEY, A., OSAKU, C.A., ROCHA, S.N., SOCCOL, C.R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid state fermentation. *Enz. and Microbial Technol.*, v. 32, p. 246-251, 2003.
- GERVAIS, P., MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 85-101, 2003.
- GHANEM, N.B., YUSEF, H.H., MAHROUSE, H.K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Biores. Technol.*, v. 73, p. 113-121, 2000.
- GILL, I., VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part 2: biotransformations and biotechnological applications. *Trends in Biotechnol.*, v. 15, p. 470-478, 1997.
- 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 Biochem.*, v. 35, p. 85-90, 2000.
- GUTARRA, M.L.E., CASTILHO, L.R., FREIRE, D.M.G. Seleção de fungos produtores de lipase por fermentação no estado sólido. CD-Rom. Simpósio Internacional de Fermentações - SINAFERM, Florianópolis, SC, 2003.

- ITOH, T., EMOTO, S., KONDO, M. Synthesis of enantiomerically pure tributylstannylcyclopropanes through lipase-catalyzed reaction. *Tetrah.*, v. 54, p. 5225-5232, 1998.
- JAEGER, K.E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B.W., COLSON, C., VAN HEUVEL, M., MISSET, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 15, p. 29-63, 1994.
- JAEGER, K.E., REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnol.*, v.16, p.396-403, 1998.
- JESUS, M.F.C.P., BRANCO, R.N., SANT'ANNA Jr., G.L., FREIRE, D.M.G., SILVA Jr., J.G. Penicillium restrictum lipases: a comparative study and characterization of enzymes with different degrees of purity. *Braz. J. of Chem. Eng.*, v. 16, p. 113-118, 1999.
- JUNG, F.B., CAMMAROTA, M.C., FREIRE, D.M.G. Tratamento de efluentes com elevado teor de gordura: enzimas/lodos ativados. CD-Rom, XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ, Natal, RN, 2002.
- KAMINI, N.R., MALA, J.G.S., PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochem.*, v. 33, p.505-511, 1998.
- KLIBANOV, A.M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water. *Trends in Biotechnol.*, v. 15, p. 97-101, 1997.
- KOUTINAS, A.A., WANG, R., WEBB, C. Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. *Biochem. Eng. J.*, v. 14, p. 93-100, 2003.
- LEAL, M.C.M.R. *Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios*. Rio de Janeiro: 2000. Tese de Mestrado. Programa de Engenharia Química da COPPE, UFRJ.
- LEAL, M.C.M.R., CAMMAROTA, M.C., FREIRE, D.M.G., SANT'ANNA Jr., G.L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. *Braz. J. of Chem. Eng.*, v. 19, p. 175-180, 2002.

- LEAL, M.C.M.R., FREIRE, D.M.G., CAMMAROTA, M.C., SANT'ANNA Jr., G.L. Estudo das condições de produção de lipases pelo fungo *Penicillium restrictum* utilizando planejamento experimental. CD-Rom. Simpósio Internacional de Fermentações - SINAFERM, Florianópolis, SC, 2003.
- LONSANE, B. K., GHIDYAL, N.P., BUDIATMAN, S., RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enz. and Microbial Technol.*, v. 7, p. 258-265, 1985.
- 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 Biochem.*, v. 38(5), p. 715-721, 2002.
- MAIA, M.M.D., HEASLEY, A., MORAIS, M.M.C., MELO, E.H.M., MORAIS Jr., M.A., LEDINGHAM, W.M., LIMA FILHO, J.L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Biores. Technol.*, v. 76, p. 23-27, 2001.
- MAIA, M.M.D., MORAIS, M.M.C., MORAIS Jr., M.A., MELO, E.H.M., LIMA FILHO, J.L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. *Rev. de Microbiol.*, v.30, p. 01-10, 1999.
- MARAS, M., VAN DIE, I., CONTRERAS, R., VAN DEN HONDEL, C.A. Filamentous fungi as production organisms for glycoprotein medical interest. *Glycoconj. J.*, v. 16, p. 99-107, 1999.
- MASSE, L., KENNEDY, K.J., CHOW, S.P. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. *J. of Chem. Technol. and Biotechnol.*, v. 76, p. 629-635, 2001.
- MEIRA, J.A., SANTOS, M.M., LIMA, V.M.G., MITCHELL, D.A., KRIEGER, N. Produção de lipases por *Burkholderia cepacia* em fermentação no estado sólido. CD-Rom. Simpósio Internacional de Fermentações - SINAFERM, Florianópolis, SC, 2003.

- MENDES, A.A., CASTRO, H.F. Biotratamento para redução do teor de lipídeos presentes em efluentes das indústrias de produtos lácteos. CD-Rom. Simpósio Internacional de Fermentações - SINAFERM, Florianópolis, SC, 2003.
- MIRANDA, O.A., SALGUEIRO, A.A., PIMENTEL, M.C.B., LIMA FILHO, J.L., MELO, E.H.M., DURÁN, N. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. *Biores. Technol.*, v. 69, p. 145-147, 1999.
- MITCHELL, D.A., VON MEIEN, O.F., KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochem. Eng. J.*, v 13, p.137-147, 2003a.
- MITCHELL, D.A., KRIEGER, N., VON MEIEN, O.F., LUZ Jr., L.F.L. Minicurso, "Introdução ao projeto e operação de biorreatores de fermentação em estado sólido". Simpósio Internacional de Fermentações, SINAFERM – (Notas de aula), Florianópolis, SC, 2003b.
- NORMAS Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ª edição. São Paulo: Imprensa oficial do estado, S. A. IMESP, 1985, v 1.
- NOVOZYMES. <http://www.novozymes.com/>, 2003.
- PALMA, M.B., PINTO, A.L., GOMBERT, A.K., SEITZ, K.H., KIVATINITZ, S.C., CASTILHO, L.R., FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, v. 84-86, p.1137-1145, 2000.
- PALMA, M.B., SEÁRA, F., MARIOTTO, J., FURIGO Jr., A. Utilização de reatores de coluna para a produção de endo- $\beta$ -1,4-xilinases por cultivo em meio sólido. CD-Rom, XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ, Natal, RN, 2002.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 81-84, 2003.

- PANDEY, A., SOCCOL, C.R. *Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications*. Londres, Asiatec Publishers, 2001, 221p.
- PANDEY, A., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., BRAND, D., MOHAN, R., ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochem. Eng. J.*, v. 6, p. 153-162, 2000a.
- PANDEY, A., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Biores. Technol.*, v. 74, p. 69-80, 2000b.
- PASTORE, G.M., COSTA, V.S.R., KOBLITZ, M.G.B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. *Ciênc. e Tecnol. de Alim.*, v.23, p. 135-140, 2003.
- PASTORE, G.M. Fermentação por fungos filamentosos, produção, purificação e aplicação de enzimas microbianas. "Curso: Fermentation Technology - Módulo II". UFSC, Florianópolis, SC, 2000.
- PEREIRA, E.B., TEIXEIRA, R.M., CASTRO, H.F., FURIGO Jr., A. Tratamento enzimático utilizando lipases em rejeitos industriais frigoríficos. CD-Rom, XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ, Natal, RN, 2002.
- PINTADO, J., TORRADO, A., GONZÁLEZ, M.P., MURADO, M.A. Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid-state culture of *Aspergillus niger* on polyurethane foams. *Enz. and Microbial Technol.*, v. 23, p. 149-156, 1998.
- RAGHAVARAO, K.S.M.S., RANGANATHAN, T.V., KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 127-135, 2003.
- RAO, P.V, JAYARAMAN, K., LAKSHMANAN, C. M. Production of Lipase by *Candida rugosa* in Solid State Fermentation. 1: Determination of Significant Process Variables. *Process Biochem.*, v. 28, p. 385-389, 1993.

- REZENDE, M.I., BARBOSA, A.M., VASCONCELOS, A.F.D., ENDO, A.S. Xylanase production by *Trichoderma harzianum* rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Braz. J. of Microbiol.*, v. 33, p. 67-72, 2002.
- RIGONI, R.E., RIGO, E., FREIRE, D.M.G., OLIVEIRA, D., DI LUCCIO, M. Utilização de lipases como auxiliar na degradação de gordura do flotado de indústria de carnes. CD-Rom. Simpósio Internacional de Fermentações - SINAFERM, Florianópolis, SC, 2003.
- ROBINSON, T., NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 197-203, 2003.
- SANGSURASAK, P., MITCHELL, D.A. Validation of a model describing two-dimensional heat transfer during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. *Biotechnol. and Bioeng.*, v. 60, p. 739-749, 1998.
- SANTOS, E., PIOVAN, T., ROBERTO, I.C., MILAGRES, A.M.F. Kinetics of the solid state fermentation of sugarcane bagasse by *Thermoascus aurantiacus* for the production of xylanase. *Biotechnol. Letters*, v. 25, p. 13-16, 2003.
- SATO, K., SUDO, S. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology - Small-scale solid-state fermentations*. 2<sup>a</sup> edition, Washington, 1999, p. 61-79.
- SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.*, v. 19, p. 627-662, 2001.
- SHARMA, A., CHATTOPADHYAY, S. Enantio-reversal in *Candida rugosa* lipase-catalyzed esterification of 3-hydroxybutyric acid. *J. of Molec. Catal. B: Enzim.*, v. 10, p. 531-534, 2000.
- SOCOL, C.R., MARIN, B., RAIMBAULT, M., LEBEAULT, L.M. Potential of solid state fermentation for production of L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 41, p. 286-290, 1994.

- SOCCOL, C.R., VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 205-218, 2003.
- TENGERDY, R.P., SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 169-179, 2003.
- UL-HAQ, I., IDREES, S. e RAJOKA, M. I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. *Process Biochem.*, v.37, p.637-641, 2002.
- UNDURRAGA, D., MARKOVITS, A., ERAZO, S. Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. *Process Biochem.*, v.36, p.933-939, 2001.
- USDA - U.S. Department of Agriculture, nutrient data laboratory, home page, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>, 2004.
- VANDENBERGHE, L.P.S., SOCCOL, C.R., PANDEY, A., LEBEAULT, J.M. Solid state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Biores. Technol.*, v. 74, p. 175-178, 2000.
- VAN RIEL, N.A.W., GIUSEPPIN, M.L.F., TERSCHURE, E.G., VERRIPS, C.T. A Structured, Minimal parameter Model of the Central Nitrogen Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the Prediction of the Behaviour of Mutants. *J. of Theor. Biol.*, v. 191, p.397-414, 1998.
- VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., FAVELA-TORRES, E., AGUILAR, C.N., RÓMERO-GOMEZ, S.J., DÍAZ-GODÍNEZ, G., AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 157-167, 2003.
- VOET, D., VOET, J.G. *Biochemistry*. 2ª edição, New York, Ed. John Wiley e sons, inc., 1995, USA.

- VON MEIEN, O.F., MITCHELL, D.A. A two-phase model for water and heat transfer within an intermittently-mixed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration. *Biotechnol. and Bioeng.*, v. 79, p. 416-428, 2002.
- ZHANG, X., MO, H., ZHANG, J., LI, Z. A solid-state bioreactor coupled with forced aeration and pressure oscillation. *Biotech. Letters*, v. 25, p. 417-420, 2003.
- ZHANG, L.Q., ZHANG, Y.D., XU, L. *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of RGD diamide in aqueous water-miscible organic solvents. *Enz. and Microbial Technol.*, v. 29, p. 129-135, 2001.

## 7 ANEXO I

### Procedimentos para o preparo de algumas soluções

#### 1. Hidrolisado de levedura

Dissolver 120 g de fermento biológico em 171 mL de H<sub>2</sub>O (70 % p/v), gotejar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> até atingir pH 2,0. Incubar a mistura por 2 horas entre 70 a 80 °C. Resfriar a mistura e centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante deve ser desprezado.

#### 2. Solução de azocaseína 0,5%

Pesar 1 g de azocaseína, adicionar 20 mL de água destilada, acrescentar solução de hidróxido de sódio 40% até chegar a pH 12,0. Adicionar ácido acético até chegar ao pH 5,0, completar o volume para 200 mL com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0.

#### 3. Solução de acetil acetona em Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 N

Misturar 1 mL de acetil acetona em 50 mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 N.

Obs: Esta solução não pode ser estocada, deve ser preparada na hora do ensaio.

#### **4. Reagente de Erlich**

Dissolver 2,67 g de DAB (p-dimetilaminobenzaldeído) em um volume pequeno de etanol/ácido clorídrico 1:1. Após a dissolução, completar o volume para 100 mL com água destilada.