



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL**

ARTHUR FAGUNDES DOS SANTOS TEODORO

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS PARA PRODUÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS
VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

VITÓRIA - ES

2018

ARTHUR FAGUNDES DOS SANTOS TEODORO

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS PARA PRODUÇÃO DE LIPASES
FÚNGICAS VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Desenvolvimento Sustentável da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Engenharia e Desenvolvimento Sustentável.

Orientador: Prof. Dr. Servio Tulio Alves Cassini.

Co-orientador: Prof. Dr. Celson Rodrigues.

VITÓRIA - ES

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial Tecnológica,
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Teodoro, Arthur Fagundes dos santos, 1985

D000a Aproveitamento de resíduos para produção de lipases fúngicas
via fermentação em estado sólido / Arthur Fagundes dos Santos
Teodoro – 2018.

xxx f. : il.

Orientador: Servio Tulio Alves Cassini.

Coorientador: Celson Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Engenharia e Desenvolvimento
Sustentável) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro
Tecnológico.

1. Lipases. 2. Resíduos sólidos. 3. Fermentação em estado
sólido I. Cassini, Servio Tulio A. Cassini. II. Rodrigues, Celson. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Tecnológico. IV.
Título.

CDU: xxx

ARTHUR FAGUNDES DOS SANTOS TEODORO

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS PARA PRODUÇÃO DE LIPASES
FÚNGICAS VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Desenvolvimento Sustentável (Modalidade Profissional) da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Desenvolvimento Sustentável na área de concentração Gestão Sustentável e Energia.

Aprovada em xx de xxxx de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. DSc. XXXXXXXXXXXXXXXX

Examinadora Interna

PPGES / UFES

Prof^a. Dsc. xxxxxxxxxxxxxxxx

Examinadora Externa

DETEC / CEUNES / UFES

Prof. DSc. Celson Rodrigues

Co-orientador

PPGES / UFES

Prof. DSc. Servio Tului A. Cassini

Orientador

PPGES / UFES



A minha mãe e minha avó por todo o suporte durante a minha vida. Obrigado por sempre acreditarem no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Servio Tulio, pela orientação, paciência e compreensão.

Ao professor Celson, pelas sábias palavras de incentivo e por todo conhecimento compartilhado.

A minha família por toda cumplicidade e amor.

RESUMO

Lipases são enzimas responsáveis pela catálise de reações de uma grande variedade de processos industriais. A fermentação em estado sólido aparece como uma alternativa para produção de enzimas devido ao baixo custo e possibilidade de se utilizar resíduos de baixo valor agregado e com grande abundância no meio, além de necessitar de uma menor quantidade de energia em comparação com a fermentação submersa. Este trabalho teve como objetivo produzir lipases pelos fungos *Penicillium sp.* e *Rhizomucor sp.* via fermentação em estado sólido utilizando como meio de suporte bagaço de cana-de-açúcar e fibra de côco. Inicialmente foram realizados ensaios preliminares com o intuito de testar a utilização ou não de uma solução nutritiva. Após os ensaios, buscou-se otimizar a produção de enzimas por meio de um planejamento experimental 3^3 , onde foram estudados a influência da concentração de indutor (óleo de soja) em 2,5%, 5% e 10%, a temperatura de 27°C, 30°C e 33°C, e capacidade de retenção de campo de 40%, 60% e 80%, para cada meio de suporte e fungo. Com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar como meio de suporte, o *Penicillium sp.* apresentou a maior atividade lipásica (147,5 U/g) nas condições de 30°C de temperatura, 60% de Capacidade de campo e 5% do indutor, com a Concentração do indutor e a Temperatura com influência significativa nos resultados. O *Rhizomucor sp.* apresentou a maior atividade lipásica (161,3 U/g) nas mesmas condições acima citadas e com a mesma influência significativa nos resultados. Para a fibra de côco, o *Penicillium sp.* apresentou a maior atividade lipásica (75 U/g) nas condições de 30°C de temperatura, 60% de umidade e 10% do indutor, com a Capacidade do campo, Concentração do indutor e Temperatura com influência significativa nos resultados. O *Rhizomucor sp.* apresentou a maior atividade lipásica (78,9 U/g) nas mesmas condições acima citadas e com a mesma influência nos resultados.

Palavras-chave: lipases; enzimas; fermentação em estado sólido; *Penicillium sp.*; *Rhizomucor sp.*

ABSTRACT

Lipases are enzymes responsible for the catalysis of reactions from a wide variety of industrial processes. Solid fermentation appears as an alternative for the production of enzymes due to the low cost and possibility of using residues of low value and with great abundance, besides requiring a smaller amount of energy in comparison to the submerged fermentation. This work had as objective to produce lipases by the fungi *Penicillium sp.* and *Rhizomucor sp.* by solid fermentation using sugar cane bagasse and coconut fiber. Initially, preliminary tests were carried out to test the use of a nutrient solution. After the tests, the enzyme production was optimized through an experimental design 33, where the influence of the inducer concentration (soybean oil) was studied in 2.5%, 5% and 10%, at a temperature of 27 ° C, 30 ° C and 33 ° C, and 40%, 60% and 80% field retention capacity for each medium and fungus. With the use of sugarcane bagasse as a support medium, *Penicillium sp* presented the highest lipase activity (147,5 U/g) at 30°C temperature, 60% field capacity and 5% of the inductor, with the Inductor Concentration and Temperature with significant influence on the results. *Rhizomucor sp* had the highest lipase activity (161,3 U/g) under the same conditions mentioned above and with the same significant influence on the results. For coconut fiber, *Penicillium sp* presented the highest lipase activity (75 U/g) under conditions of 30 ° C temperature, 60% humidity and 10% of the inductor, with field capacity, concentration of the inductor and temperature with significant influence on results. *Rhizomucor sp* had the highest lipase activity (78,9 U/g) under the same conditions mentioned above and with the same influence in the results.

Keywords: lipases; solid state fermentation; *Penicillium sp.*; *Rhizomucor sp.*



LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classes De Enzimas E Aplicações	18
Tabela 2: Aplicação De Lipases Conforme O Tipo De Reação Catalisada	20
Tabela 3: Fontes, Origens E Métodos De Obtenção De Lipases.....	22
Tabela 4: Principais Fungos Envolvidos Na Produção De Lipases Por Fes.....	29
Tabela 5: Composição Da Solução Nutriente	34
Tabela 6: Variáveis De Cultivo E Níveis De Estudo Utilizados Na Produção Enzimática	36
Tabela 7: Parâmetros De Cultivo Para Cada Fungo.....	37
Tabela 8: Valores De Atividade Enzimática Em Diferentes Condições De Cultivo Para O Fungo <i>Penicillium Sp.</i>	40
Tabela 9: Valores De Atividade Enzimática Em Diferentes Condições De Cultivo Para O Fungo <i>Rhizomucor Sp.</i>	41
Tabela 10: Estimativas Dos Efeitos Para A Produção Enzimática De <i>Penicillium Sp.</i> Com Bagaço De Cana-De-Açúcar.....	43
Tabela 11: Análise Da Variância (Anova) Para A Produção Enzimática De <i>Penicillium Sp.</i> Com Bagaço De Cana-De-Açúcar.....	44
Tabela 12: Estimativas Dos Efeitos Para A Produção Enzimática De <i>Penicillium Sp.</i> Com Fibra De Côco.	47
Tabela 13: Análise Da Variância (Anova) Para A Produção Enzimática De <i>Penicillium Sp.</i> Com Fibra De Côco.....	48
Tabela 14: Estimativas Dos Efeitos Para A Produção Enzimática De <i>Rhizomucor Sp.</i> Com Bagaço De Cana-De-Açúcar.....	51
Tabela 15: Análise Da Variância (Anova) Para A Produção Enzimática De <i>Rhizomucor Sp.</i> Com Bagaço De Cana-De-Açúcar.....	52
Tabela 16: Estimativas Dos Efeitos Para A Produção Enzimática De <i>Rhizomucor Sp.</i> Com Fibra De Côco.	55
Tabela 17: Análise Da Variância (Anova) Para A Produção Enzimática De <i>Rhizomucor Sp.</i> Com Bagaço De Cana-De-Açúcar.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação Da Fermentação Submersa.	27
Figura 2: Representação Da Fermentação Em Estado Sólido	28
Figura 3: Pequenas Porções Do Fungo Repicadas Na Forma De Estrela Na Placa De Petri Com Meio Sabouraud.	32
Figura 4: Curva De Crescimento Do <i>Penicillium Sp.</i>	38
Figura 5: Curva De Crescimento Do <i>Rhizomucor Sp.</i>	39
Figura 6: Diagrama De Pareto Com Os Efeitos Das Variáveis Da Produção Enzimática De <i>Penicillium Sp.</i> Com Bagaço De Cana-De-Açúcar Com 95% De Confiança.	44
Figura 7: Valores Preditos Versus Valores Experimentais Da Produção Enzimática Do <i>Penicillium Sp.</i> Com Bagaço De Cana-De-Açúcar.....	45
Figura 8: Superfície De Resposta Para A Produção Enzimática Do <i>Penicillium Sp.</i> Com Bagaço De Cana-De-Açúcar.	46
Figura 9: Diagrama De Pareto Com Os Efeitos Das Variáveis Da Produção Enzimática De <i>Penicillium Sp.</i> Com Fibra De Côco Com 95% De Confiança.	48
Figura 10: Valores Preditos Versus Valores Experimentais Da Produção Enzimática Do <i>Penicillium Sp.</i> Com Fibra De Côco.	49
Figura 11: Superfície De Resposta Para A Produção Enzimática Do <i>Penicillium Sp.</i> Com Fibra De Côco.	50
Figura 12: Diagrama De Pareto Com Os Efeitos Das Variáveis Da Produção Enzimática De <i>Rhizomucor Sp.</i> Com Bagaço De Cana-De-Açúcar Com 95% De Confiança.	52
Figura 13: Valores Preditos Versus Valores Experimentais Da Produção Enzimática Do <i>Rhizomucor Sp.</i> Com Bagaço De Cana-De-Açúcar.....	53
Figura 14: Superfície De Resposta Para A Produção Enzimática Do <i>Rhizomucor Sp.</i> Com Bagaço De Cana-De-Açúcar.....	54
Figura 15: Diagrama De Pareto Com Os Efeitos Das Variáveis Da Produção Enzimática De <i>Rhizomucor Sp.</i> Com Fibra De Côco Com 95% De Confiança.	56
Figura 16: Valores Preditos Versus Valores Experimentais Da Produção Enzimática Do <i>Rhizomucor Sp.</i> Com Fibra De Côco.....	57

Figura 17: Superfície De Resposta Para A Produção Enzimática Do <i>Rhizomucor</i> <i>Sp.</i> Com Fibra De Côco.	58
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

DQO – Demanda química de oxigênio

ETE – Estação de tratamento de esgoto

FES – Fermentação em estado sólido

FS – Fermentação submersa

F02 – Isolado F02 do fungo *Penicillium sp*

F18 – Isolado F18 do fungo *Rhizomucor sp*

LABSAN – Laboratório de Saneamento da UFES

U/g – Unidade de atividade enzimática por grama



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 LIPASES	18
3.1.1 Aplicações De Lipases	19
3.1.2 Fontes de Lipases	21
3.2 PRODUÇÃO DE LIPASE MICROBIANA	25
3.2.1 Fermentação submersa (FS)	26
3.2.2 Fermentação em Estado Sólido (FES)	28
4. METODOLOGIA	31
4.1 MATERIAL	31
4.1.1 Preparo do inóculo	31
4.1.2 Preparo dos meios de suporte	33
4.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)	33
4.2.1 Preparo de solução tampão e solução nutriente	34
4.3 EXTRAÇÃO DA ENZIMA	34
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	35
4.4.1 Determinação da atividade hidrolítica	35
4.4.2 Otimização das condições do processo de fermentação em estado sólido .	36
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38

5.1 Cinética de crescimento do microrganismo.....	38
5.2 Produção enzimática.....	39
5.3 Otimização do processo fermentativo	39
5.3.1 Análise estatística da produção enzimática de <i>Penicillium</i> sp. utilizando bagaço de cana-de-açúcar	42
5.3.2 Análise estatística da produção enzimática de <i>Penicillium</i> sp. utilizando fibra de côco.....	46
5.3.3 Análise estatística da produção enzimática de <i>Rhizomucor</i> sp. utilizando bagaço de cana-de-açúcar.....	50
5.3.4 Análise estatística da produção enzimática de <i>Rhizomucor</i> sp. utilizando fibra de côco.....	54
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática é um campo promissor dentro das novas tecnologias de síntese de compostos. O seu interesse vem aumentando a cada dia devido a ampliação do potencial de aplicação de enzimas como catalisadores em processos industriais. Aproximadamente dois terços das pesquisas em síntese orgânica por biotransformação envolvem enzimas hidrolíticas (lipases, proteases e estereases) (CORTEZ et al., 2017). Devido sua versatilidade, as lipases se destacam no cenário mundial de enzimas pois permitem a catálise de reações e de síntese de forma quimio, regio e enantiosseletiva. Destaque para as reações de hidrólise, e de esterificação e transesterificação de lipídeos (triacilglicerol acil hidrolases, E.C.3.1.1.1). Seu potencial de aplicação é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, estabilidade quanto à temperatura, pH e solventes orgânicos (ROVEDA, 2007; ROVEDA, HEMKEMEIER e COLLA, 2010). Dentre as vantagens dos processos enzimáticos em comparação com os processos químicos convencionais estão as velocidades das reações por enzimas superiores em relação aquelas não catalisadas, por um fator de 10^8 - 10^{10} . Conforme a literatura, o vasto poder catalítico das enzimas, pode alcançar, por exemplo, velocidades de reação aproximadamente 10^{10} a 10^{26} vezes superiores aos encontrados na ausência do catalisador (CORTEZ et al., 2017).

A bioconversão de resíduos tornou-se, atualmente, um objetivo como forma de se compensar a poluição. Águas residuárias das cidades possuem em sua composição uma quantidade considerável de lipídeos (gorduras, óleos e graxas). Refinarias de óleos comestíveis, frigoríficos, curtumes e indústrias de laticínios produzem efluentes com elevadas concentrações deste composto (MENDES et al., 2005). A utilização de enzimas como as lipases, com função hidrolítica, pode ser de grande interesse nos sistemas de tratamento de destes efluentes. Este tipo de tratamento apresenta a não geração de subprodutos tóxicos, condições moderadas de operação, redução de custos em termos de energia tornando o processo atrativo sob os pontos de vista econômico e ambiental (RIGO, 2004; SINGH e SINGH, 2010). Além disso, óleos e graxas residuais podem ser

utilizados como matéria prima em processos industriais, como a geração de biocombustíveis, em função do custo baixo ou custo inexistente. Esta utilização tem sido estudada e defendida (SAIFUDDIN e CHUA, 2006; EL-MASRY, EL-BESTAWI e EL-ADL, 2004). Com base em indicadores, científico e tecnológico, DAIHA et al., (2015) relataram que a importância das lipases como biocatalisadores ainda possui um elevado grau de interesse para aplicação em diversos segmentos industriais, com projeção de crescimento de demanda mundial estimada em 6,2% por ano, atingindo US\$ 345 milhões em 2017 (CORTEZ et al., 2017).

Os fungos têm sido reportados como as principais fontes de lipases para fins comerciais pois, geralmente, sua produção é extracelular, facilitando sua extração do meio de fermentação, além de serem considerados seguros para manipulação (BRITO, 2012; COLEN, 2006). No entanto, os custos dos processos enzimáticos em relação aos processos químicos ainda são elevados. Uma alternativa para melhorar a recuperação da enzima nos processos biocatalíticos é a utilização de enzimas imobilizadas, devido à possibilidade de sua reutilização após o processo. (SINGH e SINGH, 2010).

A fermentação em estado sólido (FES) aparece como uma alternativa promissora para produção de enzimas. É uma tecnologia de baixo custo por apresentar possibilidade de se utilizar resíduos de baixo valor agregado e com grande abundância no meio, além de necessitar de uma menor quantidade de energia em comparação com a fermentação submersa. Este processo é uma maneira eficiente para produção de enzimas por fungos pois propicia aos microrganismos condições similares ao seu habitat natural (FERNANDES, 2007; DAMASO et al., 2008; LIMA JUNIOR, 2009).

O presente trabalho objetiva avaliar a produção de lipases pelo isolado fúngico F02 (*Penicillium* sp) e F18 (*Rhizomucor* sp), obtidos no LABSAN, por fermentação em estado sólido (FES), utilizando como meio de suporte, materiais fibrosos com alta disponibilidade no meio, como o bagaço de cana-de-açúcar e a fibra de coco.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de uso de bagaço de cana de açúcar e fibra de côco como meio de suporte para a produção de lipases fúngicas por Fermentação no Estado Sólido a partir dos fungos *Penicillium sp.* (F02) e *Rhizomucor sp.* (F18).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o potencial de produção de lipases pelo fungo *Penicillium sp.* e *Rhizomucor sp* utilizando a fermentação em estado sólido;
- 2) Otimizar os parâmetros de produção de lipases pelo fungo *Penicillium sp.* e *Rhizomucor sp* utilizando óleo de soja como indutor.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LIPASES

Enzimas apresentam propriedades que propiciam seu uso como catalisadores. Elas atuam acelerando reações de conversão de substratos em produtos específicos (OLIVEIRA e MANTOVANI, 2009). Ao contrário dos catalisadores não enzimáticos, elas não necessitam de valores extremos de pH e altas temperaturas para realizarem transformações de forma seletiva e rápida (COLEN, 2006; RIBEIRO et al., 2011). Com a sua alta especificidade, as enzimas catalisam estas reações moleculares sem a ocorrência de reações paralelas indesejáveis, comum em sínteses químicas (PATEL, 2002). A Tabela 1 demonstra, conforme Oliveira e Mantovani (2009), as classificações e os tipos comuns de reações promovidas por enzimas.

Tabela 1: Classes de enzimas e aplicações

Classes de	Subclasses mais utilizadas	Reações mais comuns
Hidrolases	Esterases, lipases, amidases	Hidrólise e formação de ésteres,
Oxidorreductases	Desidrogenases, mono e	Oxidadação e redução de
Transferases	Quinases	Fosforilação (dependente de
Ligases	Aldolases, transaldolases,	Reação aldólica, formação de
Liasas	Carboxiliasas, amônia-liases,	Adição e eliminação em ligações
Isomerases	Racemases, epimerases	Isomerizações como

Fonte: Livros de Bioquímica.

Dentre as diversas enzimas, uma que se destaca são as lipases. As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas capazes de catalisar reações envolvendo óleos e gorduras. Classificadas como hidrolases, atuam na interface óleo-água catalisando a hidrólise de triacilgliceróis liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Além disso, em meio aquo-restritos, essas enzimas podem catalisar reações de síntese, como esterificação e transesterificação (JAEGER et al., 1999; SAXENA et al., 1996; SHIMADA et al., 2002; JAEGER et

al.,1994; JAEGER e REETZ, 1998; JAEGER e EGGERT, 2002; UEDA et al, 2002; ELLAIAH et. al, 2004).

Lipases podem apresentar características distintas entre si em função da grande diversidade obtida a partir de microrganismos. Geralmente não necessitam de cofatores, não sendo necessário pequenas moléculas orgânicas ou inorgânicas para realizarem suas funções. Atuam em uma ampla faixa de pH e são relativamente estáveis a altas temperaturas. Apresentam grande especificidade, ou seja, preferência em hidrolisar um determinado grupo de substrato (SAXENA et al., 2003, PANDEY, 2003; NING LI, MIN-HUA ZONG, 2010; GUPTA, GUPTA; RATHI, 2004).

3.1.1 Aplicações De Lipases

Devido a versatilidade e estabilidade, as lipases têm grande aplicação nas indústrias de alimentos, detergentes, farmacêutica, têxtil, cosmética e papeleira. Suas características permitem a síntese de compostos de alta pureza, com reduzida produção de subprodutos e resíduos (PINHEIRO, 2006).

As lipases têm sido frequentemente utilizadas na resolução de misturas racêmicas, na formulação de detergentes e síntese de biosurfactantes; no tratamento de efluentes, na indústria agroquímica; na manufatura do couro e papel; na nutrição; na produção de aromas; na formulação de perfumes, fragrâncias e cosméticos; na fabricação de plásticos e fibras sintéticas; na síntese de sedativos e outros fármacos; dentre outras (CAMMAROTA e FREIRE, 2006; HASSAN *et al.*, 2006; WILKINSON e BACHMANN, 2006). A Tabela 2 cita, conforme Fernandes (2007), aplicações de lipases já desenvolvidas.

Na indústria oleoquímica, sua utilização proporciona vantagens com a diminuição de gastos de energia e a minimização da degradação térmica dos compostos quando comparada às rotas químicas tradicionais. Seu espaço de utilização nesse campo industrial é amplo, tendo superioridade aparente. No entanto, as tecnologias para esse setor da indústria ainda não alcançaram um nível de utilização proporcional ao seu potencial de aplicações (HASAN et al., 2006, PINHEIRO, 2006).

Outra aplicação de grande importância no mercado é a utilização da lipase para a produção de biodiesel. O Biodiesel é um combustível renovável, biodegradável e ambientalmente correto, constituído de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos da reação de transesterificação de qualquer triglicerídeo com um álcool de cadeia curta como metanol ou etanol (RANGANATHAN et al. 2008).

Tabela 2: Aplicação de lipases conforme o tipo de reação catalisada

Tipos de Reações	Áreas de Aplicação	Aplicações	Produtos	Referências
Hidrólise				
	Alimentos (laticínios)	Hidrólise da gordura do leite	Agentes flavorizantes para queijos e derivados	Hasan <i>et al.</i> , 2006; Villeneuve <i>et al.</i> , 2000.
	Química (Processamento do Óleo)	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos (emulsificantes, reagentes para análise de lípidios)	Hasan <i>et al.</i> , 2006; Osório <i>et al.</i> , 2001; Undurraga <i>et al.</i> , 2001; Villeneuve <i>et al.</i> , 2000.
	Química (Detergente)	Remover manchas de óleo	Detergentes para lavanderias e uso doméstico	Hasan <i>et al.</i> , 2006; Kirk <i>et al.</i> , 2002; Sharma <i>et al.</i> , 2001.
	Medicina	Dosagem de triglicerídeos no	Kits diagnósticos	Hasan <i>et al.</i> , 2006.
Esterificação				
	Química Fina	Síntese de ésteres	Intermediários quirais ésteres, emulsificantes	Bucalá <i>et al.</i> , 2006; Fernandes <i>et al.</i> , 2006; Foreti e Ferreira, 2006; Hasan <i>et al.</i> , 2006; Romero <i>et al.</i> , 2005; Fernandes <i>et al.</i> , 2004; Ghamgui <i>et al.</i> , 2004.
	Química Alimentos	Esterificação ou transesterificação	Óleos ou gorduras, Flavorizantes e aromatizantes.	Hasan <i>et al.</i> , 2006
	Química farmacêutica	Síntese de intermediários de medicamentos-preparação de intermediários homoquirais	Drogas antiinflamatórias como naproxeno, ibuprofeno, cetoprofen, suprofen.	Wilkinson e Bachmann, 2006; Jaeger e Eggert, 2002; Zhang <i>et al.</i> , 2002; Van Dyck <i>et al.</i> , 2001.
Transesterificação				

Química Fina	Transesterificação de óleos vegetais	Biodiesel	Salis <i>et al.</i> , 2005; Hsu <i>et al.</i> , 2004; Salis <i>et al.</i> , 2003; Shimada <i>et al.</i> , 2002; Zhang <i>et al.</i> , 2002;
--------------	--------------------------------------	-----------	---

Fonte: Fernandes (2007).

3.1.2 Fontes de Lipases

Lipases são uma classe de enzimas amplamente disponíveis no meio natural. Podem ser isoladas a partir de células animais (lipases pancreáticas, gástricas e hepáticas), de células vegetais e, atualmente, tem se utilizado cada vez mais lipases de origem microbiana. Existe um grande aumento no interesse pelas lipases microbianas devido às dificuldades de acesso ao material de origem animal. Mais de 65 espécies microbianas já estão descritas como produtoras de lipases (ZHANG; GUAN, 2009; POLIZELLI et al, 2008). A Tabela 3 apresenta as principais fontes, origens e métodos de obtenção de lipases.

Tabela 3: Fontes, origens e métodos de obtenção de lipases.

FONTES	ORIGENS	MÉTODOS DE OBTENÇÃO
Vegetais	Sementes, Sucos, Polpas	Trituração de Tecidos
Animais	Mucosas, Fígado, Pâncreas	Trituração de Tecidos
Microorganismos	Bactérias, Fungos	Cultura submersa

Fonte: Hasan et al. (2006).

As enzimas microbianas são frequentemente mais utilizadas, devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, a facilidade de manipulação genética, o rápido crescimento de microrganismos em resíduos e por serem mais estáveis que as extraídas de plantas e animais, tornando sua produção mais

conveniente e segura. São também mais utilizadas devido a razões técnicas de obtenção, uma vez que enzimas vegetais necessitam de grande quantidade de plantas para se obter uma quantidade considerável e as enzimas de origem animal são subprodutos das indústrias de carne, cujo suprimento é limitado para demanda em grande escala (COLEN, 2006; HASAN et al., 2006; KAPOOR; GUPTA, 2012).

As lipases obtidas de microrganismos constituem um grupo importante de enzimas para a aplicação biotecnológica no que se refere à especificidade ao substrato e facilidade de produção em massa, sendo atrativas para o segmento industrial (HASAN et al., 2006).

Apesar de todos os avanços tecnológicos já obtidos para aperfeiçoar a síntese de lipase por meio do uso de cepas microbianas, a seleção de cepas selvagens produtoras ainda é uma solução, principalmente em países que apresentam uma grande biodiversidade. Essa busca por microrganismos que possam produzir diferentes lipases, com propriedades otimizadas, tem por objetivo gerar novas perspectivas tanto na área científica quanto na área industrial além de otimizar os processos de produção por meio de microrganismos já catalogados. Entre os microrganismos produtores estão as bactérias, os fungos filamentosos e as leveduras (SHARMA et al., 2001; COLEN, 2006; ZHANG; GUAN, 2009; PIMENTEL, 1996; SEMIONATO, 2006; LIMA JUNIOR, 2009).

3.1.2.1 Bactérias

Lipases foram detectadas em bactérias há mais de um século. Atualmente as bactérias mais utilizadas no ramo industrial são as espécies dos gêneros *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Alcaligenes* e principalmente *Pseudomonas*. A principal vantagem do uso de bactérias é o seu rápido crescimento celular em relação a outros microrganismos produtores de lipases (JEAGER et al., 1999; JOSEPH et al., 2007).

Geralmente, bactérias produzem lipases como resultado do seu crescimento em meios de cultura que contém lipídios como fonte de carbono e uma fonte orgânica

de nitrogênio. Esses microrganismos conseguem atuar em ampla variação de pH, mas apresentam melhor rendimento em ambiente alcalino (GUPTA et al., 2004).

Em algumas bactérias patogênicas, lipases foram relacionadas pela importância que apresentam no desenvolvimento de algumas doenças, tendo, em alguns casos, grande importância como fator de patogenia. Um exemplo seria a *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno produtor de lipase que causa uma variedade de doenças infecciosas em pacientes imunodeprimidos, podendo em muitos casos causar a morte (JAEGER et al., 1991, RAJENDRAN et al., 2008).

Devido ao risco da utilização de lipases de origem bacteriana, e também a sua limitação na indústria alimentícia, seu uso vem sendo diminuído em função da utilização de outros microrganismos (COLEN, 2006).

3.1.2.2 Leveduras

Com relação às leveduras, o primeiro registro que se teve da produção de lipase a partir desses microrganismos aconteceu na metade do século passado (PETERS e NELSON, 1948). A lipase produzida é constituída por várias isoformas que apresentam pequenas diferenças com relação às suas propriedades catalíticas (SHARMA et al., 2001; DE MARIA et al., 2006; PUTHLI et al., 2006). Entretanto, a quantidade de leveduras capazes de produzir lipase é muito pequena, tendo somente a *Candida rugosa* e *C. antarctica* destaque quanto às suas aplicações. (GONÇALVES, 2007, SALIHU et al, 2011).

Lipases produzidas por *Candida rugosa* tem se tornado uma das enzimas mais utilizadas na indústria devido à sua alta atividade, tanto na hidrólise, como em síntese (VAKHLU; KOUR, 2006). No Japão, utiliza-se essa lipase para a produção de ésteres a partir de mamona desde 1985 (MACRAE; HAMMOND, 1985) e há vários relatos da utilização desta lipase em diversos processos industriais (RAJENDRAN et al., 2008 ; PANDEY et al., 2001).

3.1.2.3 Fungos Filamentosos

Fungos são os microrganismos mais utilizados para produção de lipases para o ramo industrial pois normalmente excretam enzimas extracelulares, o que facilita a sua extração do meio reacional, além de serem seguros quando utilizados no ramo alimentício ou farmacêutico (PINHEIRO, 2006). São muito valorizados porque em sua maioria não são nocivos à saúde humana (JAEGER et al., 1994).

As lipases produzidas a partir de fungos são mais utilizadas por possuírem característica de alta velocidade de síntese e alto rendimento de conversão do substrato em produto. Além do fato de serem termoestáveis, elas apresentam versatilidade e simplicidade na manipulação ambiental e genética de seu potencial produtivo (SHARMA et al., 2001). Além disso, há uma grande quantidade de gêneros de fungos produtores de lipase devido a sua ampla distribuição na natureza. Dentre os gêneros de fungos filamentosos produtores de lipase, podem ser citados os das espécies *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Geotrichum* e *Rhizopus* (PIMENTEL, 1996). Segundo Colen (2006), os melhores produtores pertencem ao gênero *Geotrichum*, *Penicillium* e *Aspergillus*.

Existem poucos fungos fitopatogênicos (fungos patogênicos de plantas) e entomopatogênicos (fungos patogênicos de insetos) produtores de lipase. Podem ser citados, em relação ao primeiro, os gêneros *Alternaria* e *Colletotrichum*. Quanto ao segundo, *Beauveria* e *Metarhizium* (SILVA et al., 2005).

Fungos filamentosos, especialmente as espécies *Aspergillus* e *Penicillium*, têm sido usados amplamente na produção de enzimas, devido a um histórico de utilizações desses gêneros na produção industrial de alimentos e bebidas tradicionais como queijos, saquê, etc., além das lipases obtidas por esses gêneros já serem comercializadas amplamente (COLEN, 2006).

A produção de lipases por esses fungos é influenciada diretamente pelas condições de cultivo (pH, temperatura, concentração de nutrientes, dentre outros) e pela concentração e tipo do inóculo utilizado. As respostas as condições de cultivo também afetam de forma diferente as espécies e/ou isolados fúngicos. O mesmo fator pode estimular a produção de determinado isolado, enquanto pode

inibir ou não afetar a produção de outra espécie (RODRIGUES, 2011; Ramachandran et al., 2004).

O emergente mercado para as lipases tem exigido uma seleção de novos microrganismos produtores. Assim, estudos de fungos que apresentam maiores taxas de produção vêm sendo desenvolvidos visando à redução de custos e um consequente aumento de produtividade, além da obtenção de enzimas com características especializadas (SHARMA et al., 2001; JOSEPH et al., 2007).

3.2 PRODUÇÃO DE LIPASE MICROBIANA

Atualmente, existe uma grande diversidade de lipases sendo produzidas em escala e aplicadas comercialmente, onde a utilização industrial destas enzimas depende necessariamente da redução de custos de produção. Isso poderá ser alcançado através da seleção de novos microrganismos produtores, de melhoramento genético, de modificações no meio de cultura e de otimização das condições de cultivo e dos sistemas de produção (GUTARRA, 2003; RIGO et al., 2009).

Fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES) são as duas abordagens básicas para a produção de enzimas, tendo cada técnica vantagens e também desvantagens (SUN; XU, 2008). Na FES, o microrganismo cresce em substratos sólidos umedecidos ou suportes inertes, com baixas porcentagens de água livre, com teor de umidade de até 70%, e na FS, os substratos são dissolvidos em meio líquido contendo nutrientes solúveis (PANDEY, 2003; CASTILHO et al., 2000; MITCHELL et al., 2006; RAHARDJO et al., 2005).

Resíduos, que incluem, desde rejeitos agro-industriais até resíduos oleosos da indústria, podem servir como substratos ideais para processos microbianos utilizando a fermentação em estado sólido devido aos seus componentes orgânicos presentes grande quantidade. Tal condução experimental é interessante em virtude da similaridade com o habitat natural do microrganismo, e os insere em estreita proximidade com o conteúdo de nutrientes para o seu crescimento adequado e produção dos produtos de interesse (SINGHANIA et al., 2009).

3.2.1 Fermentação submersa (FS)

A fermentação submersa (Figura 1) é uma metodologia largamente utilizada para a produção de lipases em escala industrial pois, além de ser uma tecnologia de fácil execução e controle, apresenta satisfatórios rendimentos de produção (SANT'ANNA JR, 2001; MAIA et al., 2001). Consiste basicamente de um meio fermentativo líquido, com fontes de nutrientes solúveis (ALONSO, 2001, COLLA et al., 2010). Apresenta grande homogeneidade e, conseqüentemente, eficiente transferência de nutrientes, principalmente quando o substrato utilizado é um triglicerídeo (CASTILHO et al., 2000). A produção de enzimas por FS possui certa facilidade quando realizada em grande escala, pois, além de apresentar meio homogêneo, possibilita que os parâmetros do processo sejam monitorados através de sensores (WOLSKI, 2008; IFTIKHAR et al., 2010).

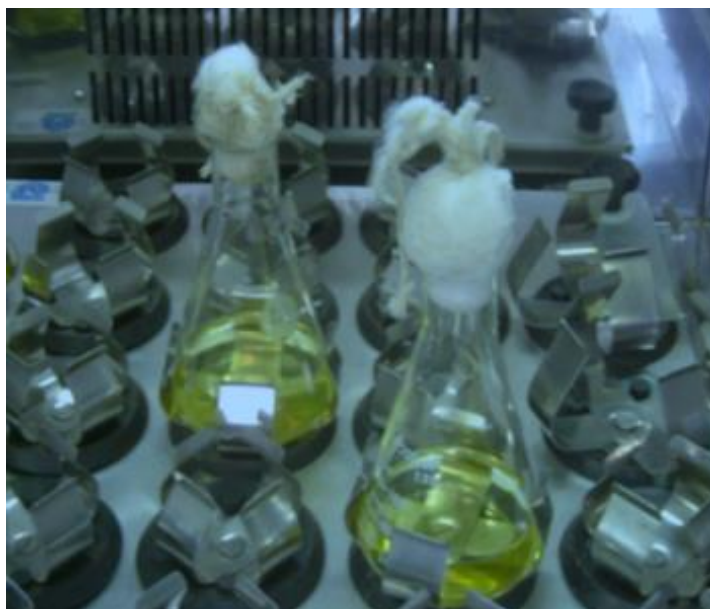


Figura 1: Representação da Fermentação Submersa.

Fonte: Fernandes (2007).

Esse método de fermentação pode ser realizado em uma variedade de sistemas, tais como frascos agitados, agitadores de bancada e fermentadores industriais (MAIA et al., 2001; ELLAIAH et al., 2004; MAHADIK et al., 2004). Estes

fermentadores podem ser operados em regime contínuo, semi-contínuo e descontínuo. Sendo que, no regime contínuo, existe a relação constante da entrada de substrato com a saída do meio fermentado. O regime descontínuo pode ser realizado em batelada, fornecendo quantidades únicas de substrato no início do experimento. Este processo apresenta baixo custo, mas necessita de um maior controle operacional para garantir as propriedades do produto final (PINHEIRO, 2006; LI et al., 2007).

A FS apresenta maior possibilidade de contaminação devido à maior quantidade de água envolvida no processo, quando comparada com a fermentação no estado sólido. Além disso, quando a enzima produzida é extracelular, comum na maioria dos microrganismos produtores, e pelo fato de estar diluída no meio de cultivo, se faz necessária uma etapa de purificação mais complexa (ALONSO, 2001).

Em relação à parte econômica, a FS geralmente apresenta alto custo quando comparada a fermentação em estado sólido, podendo apresentar valor até 70% maior (PINHEIRO, 2006; BAN et al., 2002). O processo produz grandes volumes de efluentes, além de demandar uma maior quantidade de energia (NAGY et al., 2006).

3.2.2 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (Figura 2) tem como característica a baixa atividade de água no meio. São utilizados substratos insolúveis que atuam como suporte fisiológico e fonte de nutrientes para o crescimento de microrganismos e, em casos em que os nutrientes oferecidos pelo substrato são insuficientes, é comum realizar a suplementação deste meio (ALONSO, 2001; SHRESTHA et al., 2009; PANDEY et al., 1999).



Figura 2: Representação da Fermentação em estado sólido

Fonte: Fernandes (2007).

Para a realização da FES, a escolha adequada do microrganismo é de suma importância para obtenção de bons resultados. De acordo com a classificação teórica, em termos de atividade de água, somente fungos e leveduras seriam microrganismos adequados para fermentação em estado sólido (VARGAS, 2004; COUTO; SANROMÁN, 2005). Bactérias exigem uma alta quantidade de água e, portanto, não seriam adequadas. Contudo, existem estudos que demonstram que bactérias podem ser usadas nestes processos, se bem controladas e manipuladas (PANDEY, 2003). Xu et al. (2002) relata que fungos filamentosos são os mais adequados para serem utilizados na FES por possuírem crescimento vigoroso e capacidade de utilizar substratos variáveis. A Tabela 4 mostra os principais fungos estudados para a produção de lipases por FES.

Tabela 4: Principais fungos envolvidos na produção de lipases por FES.

Microrganismo	Substrato	Referências
<i>Aspergillus oryzae</i>	Torta de óleo de coco	Ramachandran et al., 2004.
<i>Aspergillus niger</i>	Torta de gergelim	Kamini et al., 1998.
	Farelo de trigo	Mahadik et al., 2002.
	Farelo de trigo	Nagy et al., 2006.
<i>Monascus fuliginosus</i>	Bagaço de cana	Liu et al., 1995.

<i>Neurospora sp TT-241</i>	Farelo de trigo	Lin et al., 1996.
<i>Penicillium restrictum</i>	Torta de babaçu	Castilho et al., 2000.
		Palma et al., 2000.
		Gombert et al., 1999.
<i>Penicillium</i>	Torta de soja	Di Luccio et al., 2004.
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Torta de amêndoa	Dalsenter et al., 2005.
		Ul-Haq et al., 2002.
<i>Rhizopus homothallicus</i>	Bagaço-de-cana	Rodriguez et al., 2006.
		Diaz et al., 2006.
<i>Rhizopus rhizopodiformis</i>	Bagaço-de-cana	Cordova et al., 1998.
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Bagaço-de-cana	Cordova et al., 1998.

Fonte: Fernandes (2007)

A seleção e otimização dos parâmetros físico-químicos e biológicos, tais como tamanho das partículas, umidade, temperatura, pH, concentração do indutor, pré-tratamento do substrato, agitação e aeração, suplementação nutritiva e quantidade do inóculo é de grande importância (PANDEY, 2003).

Pesquisas têm demonstrado a importância da utilização de indutores para a produção de lipases, tanto na FES quanto na FS. Sua utilização como fonte de energia e carbono é necessária para a maioria dos microrganismos. Estes indutores são adicionados em concentrações reduzidas como fonte de carbono e, geralmente, são triglicerídeos, ésteres ou ácido graxo (CASTILHO et al., 2000).

A escolha do substrato também apresenta papel importante para o processo. Os substratos podem ser utilizados apenas como meio de suporte, ou também como fonte de nutrientes para crescimento. Uma grande vantagem do processo é a possibilidade da utilização de substratos com baixo valor agregado, como os resíduos agroindustriais e do saneamento (COLEN, 2006; MAHADIK et al., 2002).

Outra vantagem é a utilização direta dos esporos dos microrganismos na inoculação, evitando etapas prévias, como pré-cultivos que envolvem grandes volumes de meio e tanques para o crescimento. O desenvolvimento dos fungos ocorre em condições similares às do seu habitat natural e o fato de o meio de cultivo apresentar baixa atividade de água reduz o problema de contaminações, especialmente por bactérias (VARGAS, 2004).

Apesar da fermentação em estado sólido apresentar diversas vantagens, alguns problemas podem ser verificados, como a dificuldade na medição de pH, umidade e temperatura, devido a baixa homogeneidade (MARTINS, 2001). A automação desse processo é dificultada, exigindo maiores custos para o controle dos parâmetros. Além disso, é necessário pré-tratamento do substrato, a fim de eliminar contaminantes que possam interferir no crescimento do microrganismo e na qualidade da lipase formada (PINHEIRO, 2006).

Mesmo apresentando desvantagens, a FES mostra-se vantajosa em relação à fermentação submersa devido à possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais e do saneamento como substrato, reduzindo os custos do processo, agregando valor e destinação a estes resíduos. A FES apresenta maior produtividade, formação de produto final mais estável e em maior concentração (HÖLKER, HÖFER e LENZ, 2004; RIGO, 2009).

4. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia, vinculado ao Laboratório de Saneamento – LABSAN do Departamento de Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo (CT-UFES), localizado em Vitória, ES.

Para garantir condições estéreis de crescimento dos microrganismos, a água, os meios de cultura e/ou substratos, vidrarias e utensílios laboratoriais foram esterilizados em autoclave a 121°C, durante 20 minutos e devidamente acondicionados.

Foram determinadas as melhores condições de crescimento e de produção da enzima de acordo com o tipo de meio de suporte e adição de indutores. Nestes estudos, as fermentações foram analisadas em termos de produção de atividade lipolítica.

4.1 MATERIAL

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram os fungos *Penicillium sp.* e *Rhizomucor sp.* isolados por Rodrigues (2011), e cedidos pelo LABSAN. Os

mesmos foram repicados em meio PDA (Potato Dextrose Agar) e acondicionado em estufa bacteriológica a 30°C.

Os meios de suporte utilizados foram fibra de côco, doado pelo LABSAN, e bagaço de cana-de-açúcar doado pela empresa RAÍZEN.

Para o preparo das soluções-tampão foram utilizados os reagentes fosfato de sódio monobásico anidro e fosfato de sódio dibásico heptahidratado, da Nuclear (Brasil), ácido bórico e Bórax, da Dinâmica (Brasil), ácido acético glacial, da Vetec (Brasil) e acetato de sódio trihidratado, da Nuclear (Brasil). Para o preparo da solução nutriente, utilizou-se K₂HPO₄ (Vetec, Brasil), NaNO₃ (Nuclear, Brasil), Uréia (Chemco, Brasil), MgSO₄ (Dinâmica, Brasil), ZnSO₄ (Synth, Brasil), FeSO₄ (Synth, Brasil) e MnSO₄ (Synth, Brasil).

4.1.1 Preparo do inóculo

Utilizou-se placas de petri com meio de cultura PDA 3,9% (m/V) para o crescimento do microrganismo, repicando-se cinco porções da colônia para a placa na forma de estrela (Figura 3) e mantendo em estufa bacteriológica a 30°C por 7 dias (FREIRE, 1996).

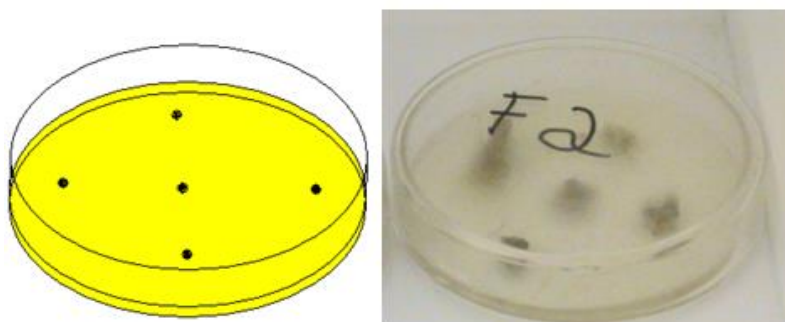


Figura 3: Pequenas porções do fungo repicadas na forma de estrela na placa de petri com meio Sabouraud.

Durante este processo, foi estudada a cinética de crescimento do microrganismo com 7 placas de petri contendo meio PDA 3,9% (m/V), mantendo-as em estufa a 30°C por 7 dias. A cada 24 horas uma placa era utilizada para contagem de

esporos em Câmara de Neubauer. A raspagem dos esporos foi realizada adicionando a placa de petri 10 ml de água deionizada esterilizada e 0,1 mL de solução TWEEN 80 0,01%. A superfície do meio foi raspada com alça descartável, transferida para frasco âmbar esterilizado e acondicionada em geladeira. Logo após foi determinada o número de esporos em suspensão da solução com o auxílio de um microscópio óptico e Câmara de Neubauer (Raimbault & Alazard, 1980, citados por HASAN, 1998).

A contagem dos esporos foi feita transferindo para a câmara 15 µL da sua solução. Logo após foram contadas as células nos 4 campos de um lado da câmara, e dividiu este valor por 4, para obter-se a média. O cálculo da concentração de esporos foi feito de acordo com a Equação 1:

$$C_{esp} \left(\frac{\text{esporos}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Número médio de esporos contados} \times \text{fator de diluição}}{4 \times 10^{-4} \text{ mL}}$$

4.1.2 Preparo dos meios de suporte

Como meio suporte para o cultivo dos microrganismos foram utilizados bagaço de cana-de-açúcar e a fibra de côco. Ambos foram secos a 55-60°C em estufa por 24 horas. Após a secagem, foram moídos, e peneirados em peneiras Tyler de 10 e 30 MESH, correspondendo ao tamanho de partícula de 0,6 e 2,0 mm. Após a seleção, foram lavados três vezes com água destilada e seco a 80°C por 24 horas (MOREIRA et al., 2007). Após a seleção, determinou-se a capacidade de retenção de campo de cada um. Os mesmos foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos em freezer. Para a caracterização, os meios de suporte foram submetidos a um processo de extração dos seus componentes. Utilizou-se tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 (DEUTSCHER, SIMON & ABELSON, 1990) na proporção 1:17 (g de sólido/mL de solução-tampão), a 35°C e 130 rpm, durante 2h em incubadora. Logo após o extrato foi filtrado e centrifugado a 2500 rpm para remoção dos sólidos suspensos. Após o procedimento se realizou a caracterização das amostras, onde determinou-se os carboidratos totais, proteínas e gorduras.

4.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

Para a realização dos experimentos foram utilizados os meios de suporte (bagaço de cana-de-açúcar e fibra de côco) citados anteriormente, a solução de esporos obtida do fungo *Penicillium sp.* ou *Rhizomucor sp.*, uma fonte de nutrientes para fornecer compostos suplementares necessários ao desenvolvimento do microrganismo no meio fermentativo, além do indutor de crescimento (óleo de soja).

As fermentações foram realizadas em erlenmeyrs de 250 ml onde foram adicionados 10 g de substrato. Os frascos foram esterelizados em autoclave a 121°C. Após, foi ajustada a capacidade de retenção do campo adicionando a solução nutriente e o indutor conforme as quantidades especificadas em cada experimento. Após o preparo, os ensaios foram inoculados assepticamente com uma solução de esporos na concentração de 10^8 e o meio fermentativo misturado com o auxílio de bastões de vidro para que homogeneizar o meio fermentativo e se atingisse uma fermentação mais eficiente. Os frascos foram incubados em estufa bacteriológica por 96 h (FERNANDES, 2007). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.1 Preparo de solução tampão e solução nutriente

Uma solução de tampão fosfato (100mM, pH 7,0) foi feita para o preparo final da solução de nutrientes. As quantidades de nutrientes utilizados para o preparo das soluções foram baseadas no meio Czapeck modificado (HASAN, 2002), para um volume final de líquido (solução-tampão) de 500 mL, e são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Composição da solução nutriente

Nutriente	Massa
K ₂ HPO ₄	6,25
NaNO ₃	1,00
Uréia	1,50
MgSO ₄	0,40
ZnSO ₄	0,25
FeSO ₄	0,25
MnSO ₄	0,10

Fonte: Hasan, 2002.

4.3 EXTRAÇÃO DA ENZIMA

Ao final da fermentação, a extração do preparado enzimático foi realizada adicionando, para a fibra de côco, 100 mL de solução-tampão fosfato de sódio (100mM, pH 7,0) e, para o bagaço de cana-de-açúcar, 150 ml do mesmo tampão. Conforme citado por IKASARI & MITCHELL, 1996, foi utilizado tampão neutro para extração a fim de se evitar alterações no equilíbrio de reação caso se utilize água, já que não se obtém um pH estável durante o processo.

Após a adição da solução, os frascos foram colocados em incubadora shaker por 30 minutos a 25°C e velocidade de agitação de 150 rpm. Este material foi prensado e filtrado em gaze para a obtenção do meio de cultivo fermentado, e centrifugado a 3000 rpm por 2 minutos para remoção de sólidos. O sobrenadante foi estocado em freezer para dosagem da atividade lipásica (GOMBERT et al, 1999).

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Determinação da atividade hidrolítica

Para dosagem da atividade de hidrólise dos extratos, foi utilizada a metodologia adaptada de Freire et al., (1997), citados por GOMBERT et al., (1999).

Foi preparado uma emulsão de óleo de oliva 10 % (m/v) e goma arábica 5 % (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. A 18 mL desta emulsão foram adicionados 2 mL da amostra do extrato bruto aquoso. Após incubação por 15 minutos a 37°C com agitação constante de 160 rpm. Após o tempo previsto, a reação era interrompida através da adição 20 ml de uma solução de acetona-etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados durante a reação eram então titulados até pH 11 com solução 0,05 M de NaOH em titulador automático. Os brancos reacionais foram preparados adicionando-se a solução de acetona-etanol e a amostra logo em seguida foi titulada.

O cálculo da atividade hidrolítica foi realizado de acordo com a Equação 2. Uma unidade de atividade hidrolítica é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de ácido graxo por minuto nas condições de reação (Cavalcanti et

al., 2005; Leal, 2000). As dosagens foram realizadas em triplicata e a média aritmética dos valores foi utilizada.

$$AH = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 1000}{t \times V_c} \times \frac{V_d}{m}$$

Onde:

AH = atividade hidrolítica (U/g);

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

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

M = molaridade da solução de NaOH (mmol/mL);

t = tempo de reação (min);

V_c = volume do extrato enzimático usado na reação (mL);

V_d = volume do solvente usado na extração (mL);

m = massa de sólido usado para extração (seco ou úmido).

4.4.2 Otimização das condições do processo de fermentação em estado sólido

Os ensaios preliminares de produção enzimática foram realizados para verificar o crescimento e a produção da enzima pelo fungo selecionado conforme o tipo de suplementação.

Esses ensaios foram realizados com bagaço de cana e fibra de côco, ambos com granulometria entre 0,6 e 2,0 mm, umidificando-os em 50 % a capacidade do campo com solução salina citada anteriormente, com água ou com tampão fosfato pH 7. O tempo e a temperatura de fermentação nesta etapa foram definidos em 96 horas e 30°C, segundo resultados obtidos em Vargas, 2004 e Fontoura, 2006 para o fungo *Penicillium simplicissimum*. Ao final da fermentação as amostras foram retiradas para posterior análise.

Após a seleção do melhor meio de suplementação, buscou-se otimizar as condições de cultivo. Para se otimizar a produção de lipases pelos fungos foi utilizada a técnica de planejamento fatorial 3³.

Tabela 6: Variáveis de cultivo e níveis de estudo utilizados na produção enzimática

Variável	Nível		
	-1	0	1
Capacidade de campo (%)	40	60	80
Concentração de indutor (%)	2,5	5	10
Temperatura	27	30	33

A Tabela 7 mostra o planejamento experimental para os parâmetros de cultivo com a utilização dos substratos selecionados.

Tabela 7: Parâmetros de cultivo para cada fungo.

Ensaio	Capacidade	Concentração	Temperatura
1	40	2,5	27
2	60	2,5	27
3	80	2,5	27
4	40	5	27
5	60	5	27
6	80	5	27
7	40	10	27
8	60	10	27
9	80	10	27
10	40	2,5	30
11	60	2,5	30
12	80	2,5	30
13	40	5	30
14	60	5	30
15	80	5	30
16	40	10	30
17	60	10	30
18	80	10	30
19	40	2,5	33
20	60	2,5	33
21	80	2,5	33
22	40	5	33
23	60	5	33
24	80	5	33
25	40	10	33
26	60	10	33
27	80	10	33

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi usado o programa computacional STATISTICA Versão 13 para calcular os efeitos principais das variáveis e suas interações, Para dizer se a variável é significativa ou não, foram considerados os parâmetros estatísticos t e p. Considerou o valor de $p < 0,05$ (95% de confiança).

Pelo teste F, se F calculado for maior que o valor de F tabelado, o modelo é válido e os parâmetros da equação se ajustam aos dados experimentais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cinética de crescimento do microrganismo

Para o analisar o efeito do inóculo na produção da enzima, foi realizada a cinética de crescimento dos microrganismos em meio de PDA. Diferentes placas com o microrganismo foram feitas e foi realizada a contagem de esporos em câmara de Neubauer determinados intervalos de tempo. O resultado pode ser observado na Figura 4 e 5.

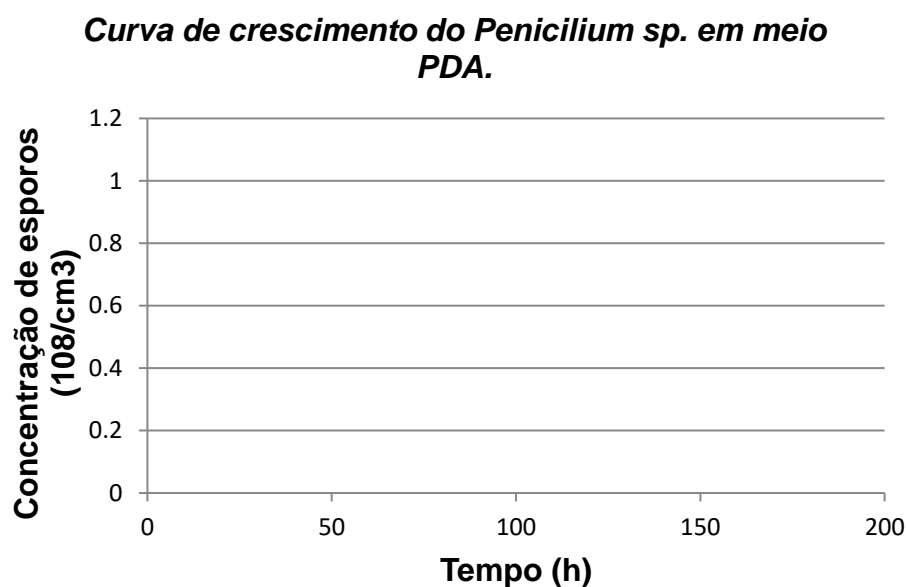


Figura 4: Curva de crescimento do *Penicillium sp.*

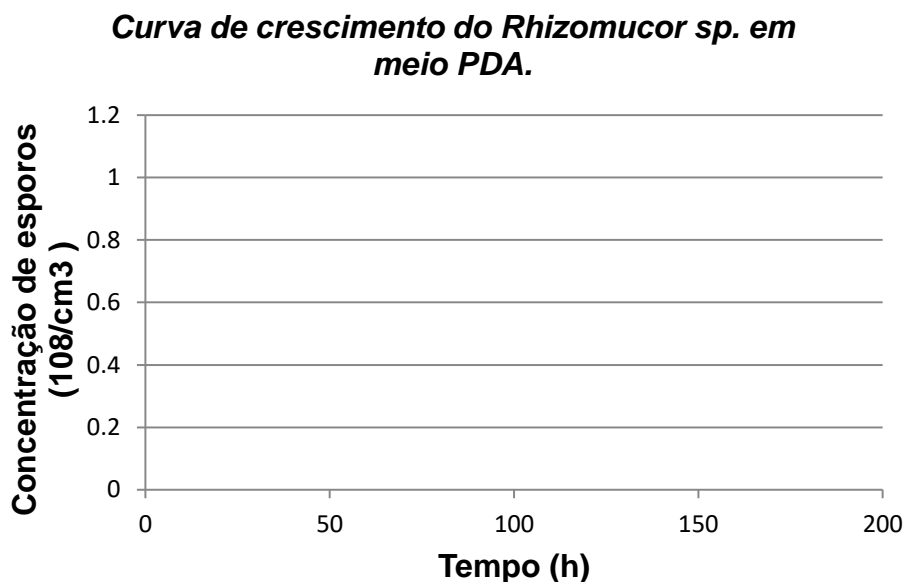


Figura 5: Curva de crescimento do *Rhizomucor sp.*

5.2 Produção enzimática

Foram realizados ensaios preliminares a fim de se verificar a influência do uso de uma solução nutritiva na produção enzimática. O teste consistiu na adição das soluções até se atingir 60% da capacidade de campo de cada meio de suporte, com a temperatura estabilizada em 30°C. Com o uso de bagaço de cana-de-açúcar como meio de suporte, obteve-se, com uso do fungo *Penicillium sp.*, 1,1 U/g, 1,8 U/g, e 8,6 U/g com a suplementação por água, tampão fosfato e solução nutritiva respectivamente. Para o fungo *Rhizomucor sp.* a produção foi 1,9 U/g, 3,9 U/g e 9,9 U/g respectivamente. Com o uso de fibra de côco, com o fungo *Penicillium sp.* obteve-se, respectivamente, 1,4 U/g, 2,4 U/g e 8,2 U/g. Com o uso de *Rhizomucor sp.* obteve-se 2,1 U/g, 4,6 U/g e 10,2 U/g respectivamente. Os resultados demonstraram que, para ambos os fungos, o uso de uma solução nutritiva influencia positivamente a produção enzimática. Com isso, foi decidido realizar os próximos experimentos com o uso da solução proposta para suplementar o meio fermentativo.

5.3 Otimização do processo fermentativo

Após os testes preliminares, foi realizada a produção enzimática utilizando bagaço de cana-de-açúcar e fibra de côco a fim de se analisar os melhores parâmetros de obtenção. O tempo de fermentação foi padronizado em 96 horas.

Foi utilizado um planejamento do tipo 3³, totalizando 27 experimentos para cada substrato. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados obtidos para os substratos encontram-se na Tabela 8 e Tabela 9.

Tabela 8: Valores de atividade enzimática em diferentes condições de cultivo para o fungo *Penicillium sp.*

Ensaio	Capacidade de campo (%)	Concentração do indutor (%)	Temperatura	Atividade enzimática (U/g)			
				Bagaço de cana		Fibra de côco	
1	40	2,5	27	6,7	± 1,6	7,8	± 0,3
2	60	2,5	27	9,2	± 0,6	8,3	± 1,4
3	80	2,5	27	20,4	± 2,1	16,1	± 0,9
4	40	5	27	50,0	± 1,0	15,0	± 1,4
5	60	5	27	60,4	± 2,6	16,4	± 0,7
6	80	5	27	63,3	± 3,1	34,4	± 0,7
7	40	10	27	46,7	± 6,2	28,3	± 3,4
8	60	10	27	42,1	± 5,6	33,1	± 2,1
9	80	10	27	39,6	± 6,2	31,1	± 4,8
10	40	2,5	30	12,1	± 3,6	14,4	± 0,9
11	60	2,5	30	9,6	± 4,1	12,8	± 2,0
12	80	2,5	30	23,3	± 6,2	19,4	± 2,7
13	40	5	30	123,3	± 2,4	20,0	± 1,4
14	60	5	30	147,5	± 2,0	33,1	± 1,7
15	80	5	30	141,3	± 2,7	53,9	± 3,4
16	40	10	30	114,2	± 6,6	42,8	± 8,9
17	60	10	30	105,8	± 7,2	75,0	± 2,7
18	80	10	30	97,9	± 7,7	51,7	± 0,8
19	40	2,5	33	6,7	± 1,6	10,0	± 1,4
20	60	2,5	33	10,0	± 2,7	9,7	± 0,7
21	80	2,5	33	20,8	± 2,1	15,3	± 1,4
22	40	5	33	53,3	± 5,1	18,3	± 3,4
23	60	5	33	60,4	± 3,9	31,9	± 2,7
24	80	5	33	61,7	± 3,6	37,2	± 1,7
25	40	10	33	42,5	± 5,4	36,7	± 2,7
26	60	10	33	40,8	± 6,6	59,4	± 4,8
27	80	10	33	32,1	± 7,5	42,2	± 5,4

Tabela 9: Valores de atividade enzimática em diferentes condições de cultivo para o fungo *Rhizomucor sp.*

Ensaio	Capacidade de campo (%)	Concentração do indutor (%)	Temperatura	Atividade enzimática (U/g)	
				Bagaço de cana	Fibra de côco
1	40	2,5	27	9,3 ± 2,9	8,3 ± 0,4
2	60	2,5	27	13,3 ± 1,6	9,4 ± 1,1
3	80	2,5	27	23,3 ± 0,6	18,9 ± 1,5
4	40	5	27	49,2 ± 3,1	20,6 ± 0,5
5	60	5	27	47,5 ± 4,1	21,4 ± 3,4
6	80	5	27	38,3 ± 5,6	35,3 ± 0,8
7	40	10	27	65,0 ± 5,4	29,4 ± 3,1
8	60	10	27	75,0 ± 4,1	35,3 ± 0,9
9	80	10	27	82,9 ± 3,6	32,2 ± 4,1
10	40	2,5	30	18,8 ± 2,7	20,8 ± 1,8
11	60	2,5	30	28,8 ± 4,7	16,1 ± 2,0
12	80	2,5	30	35,8 ± 5,1	20,6 ± 2,7
13	40	5	30	128,3 ± 3,1	22,2 ± 2,7
14	60	5	30	161,3 ± 1,0	36,7 ± 2,7
15	80	5	30	151,7 ± 5,1	58,9 ± 4,1
16	40	10	30	132,9 ± 5,0	48,3 ± 6,8
17	60	10	30	135,4 ± 6,2	78,9 ± 4,8
18	80	10	30	109,2 ± 5,1	57,8 ± 4,1
19	40	2,5	33	11,7 ± 1,6	13,9 ± 2,1
20	60	2,5	33	17,5 ± 2,7	15,0 ± 0,4
21	80	2,5	33	34,6 ± 3,3	21,1 ± 3,4
22	40	5	33	65,8 ± 5,1	25,0 ± 4,8
23	60	5	33	77,9 ± 5,0	34,2 ± 3,0
24	80	5	33	63,8 ± 8,7	41,1 ± 2,7
25	40	10	33	49,6 ± 2,1	39,4 ± 2,2
26	60	10	33	55,4 ± 3,3	64,4 ± 5,5
27	80	10	33	45,0 ± 5,4	46,1 ± 3,5

Para ambos os fungos, com base nos valores de produtividade para o processo, obteve-se um melhor resultado para o bagaço de cana-de-açúcar com 60% da capacidade do campo, 5% de concentração de indutor e 30°C de temperatura. Para a fibra de côco, obteve-se um melhor resultado com os mesmos 60% da capacidade de campo e 30°C de temperatura, porém, com 10% de concentração do indutor.

Para o bagaço de cana-de-açúcar, a adição de óleo de soja a 10%, em comparação a 5%, não ocasionou aumento na atividade hidrolítica. Alguns estudos comprovaram que suplementação adicional muitas vezes não leva ao aumento da produção de lipases devido a inibição por excesso de substrato. Di Luccio et al. (2014), observou que a produção de lipases em fermentação em estado sólido utilizando, torta de soja e o fungo *Penicillium simplicissimum*, não alterou com o uso da suplementação com óleo de soja. A suplementação da mistura de farelo de soja com casca de soja, utilizando óleo de soja para a produção de lipases por fermentação em estado sólido, com o uso do fungo *Aspergillus niger*, pesquisado por Reinehr et.al. (2016), constatou que, os ensaios com 2% de óleo de soja tiveram atividades de hidrólise superiores áquelas obtidas com 0% e 4% do indutor.

Godoy et al. (2011), obteve uma produção máxima de lipase de 155,8 U/g com o uso de resíduos de mamona e o fungo *Penicillium simplicissimum*. Kamini et al. (1998) obteve 363,3 U/g, com o uso de *Penicillium simplicissimum* e óleo de gergelim. Rigo et al. (2009) obteve uma produção máxima de lipase de 317 U/g com o uso de farelo de soja e o fungo *Penicillium sp.*. Cordova et al. (1998) obteve uma produção de 20,24 U/g de lipases com o uso de bagaço de cana-de-açúcar e azeite de oliva com o uso do fungo *Rhizomucor pusillus*. Os resultados do experimento demonstraram que, para ambos os meios de suporte utilizados, os resultados estão de acordo com a literatura, e ambos são propícios para produção de lipases fúngicas via fermentação em estado sólido.

5.3.1 Análise estatística da produção enzimática de *Penicillium sp.* utilizando bagaço de cana-de-açúcar

A análise dos principais efeitos e interações das variáveis para a produção enzimática com o uso do *Penicillium sp.* e o bagaço de cana-de-açúcar pode ser observada na Tabela 10.

Tabela 10: Estimativas dos efeitos para a produção enzimática de *Penicillium* sp. com bagaço de cana-de-açúcar.

Fator	Efeito	Erro padrão	t(17)	p	Coefficiente
Intercepto	132,961	11,059	12,022	0,000000	132,961
Capacidade de campo %(L)	3,552	9,644	0,368	0,717220	1,776
Capacidade de campo %(Q)	-1,759	16,557	-0,106	0,916623	-0,880
Indutor %(L)	49,213	9,559	5,148	0,000080	24,606
Indutor %(Q)	-123,715	18,968	-6,522	0,000005	-61,858
Temperatura (°C)(L)	-1,394	9,644	-0,145	0,886782	-0,697
Temperatura (°C)(Q)	-98,148	16,557	-5,928	0,000017	-49,074
1L by 2L	-13,036	11,496	-1,134	0,272579	-6,518
1L by 3L	-1,319	11,707	-0,113	0,911587	-0,660
2L by 3L	-2,545	11,496	-0,221	0,827464	-1,272
R ajustado = 0,76833					
(L) Linear					
(Q) Quadrática					

Nota-se que o Indutor (L) e (Q) e a Temperatura (Q) foram significativas no intervalo de confiança de 95%. Para os demais fatores e interações, o p valor foi maior que 0,05 e, com isso, estes fatores foram eliminados do modelo e considerados erros aleatórios experimentais. Isto também pode ser verificado no Gráfico de Pareto (Figura 6).

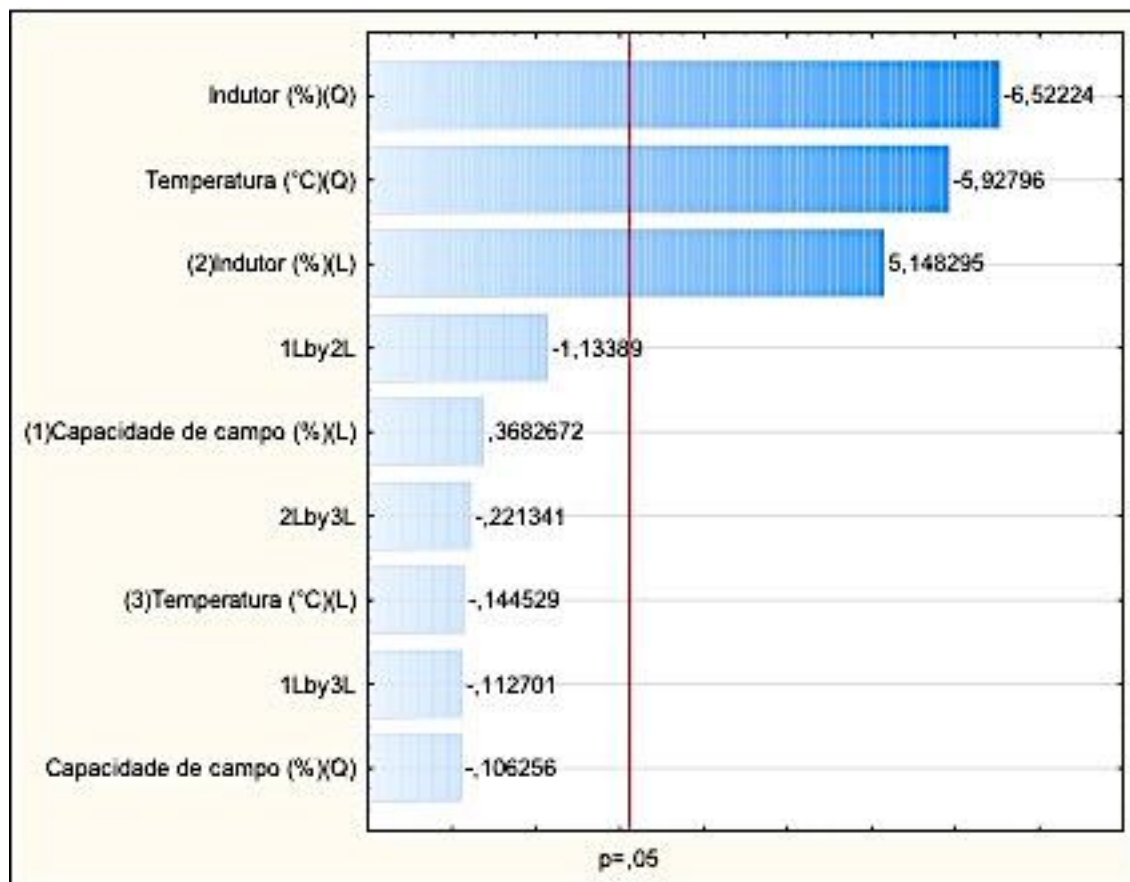


Figura 6: Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis da produção enzimática de *Penicillium sp.* com Bagaço de cana-de-açúcar com 95% de confiança.

A análise da variância (ANOVA) com os fatores significativos é mostrada na Tabela 11.

Tabela 11: Análise da variância (ANOVA) para a produção enzimática de *Penicillium sp.* com bagaço de cana-de-açúcar.

Fator	Soma	Graus de	Média	F	p
Indutor (%) (L)	10898,62	1	10898,62	32,69444	0,000008
Indutor (%) (Q)	17491,97	1	17491,97	52,47361	0,000000
Temperatura (°C) (Q)	14449,59	1	14449,59	43,34687	0,000001
Erro	7667,00	23	333,35		
Total	46146,77	26			

R = 0,81219

A Figura 7 apresenta a comparação entre os valores observados no experimento e os valores preditos pelo modelo. Os valores estão dispersos em torno da reta representativa devido ao baixo coeficiente de regressão.

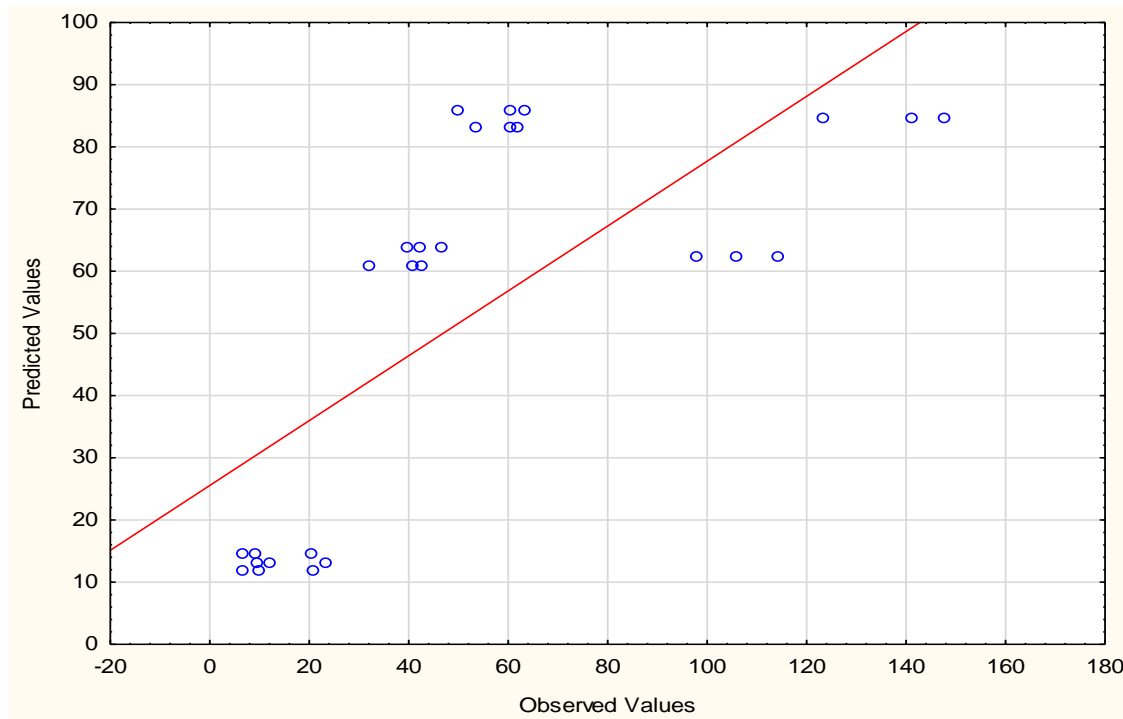


Figura 7: Valores preditos versus valores experimentais da produção enzimática de *Penicillium sp.* com bagaço de cana-de-açúcar.

Com base nos valores estatisticamente significativos observados, a produção enzimática de *Penicillium sp.* com bagaço de cana-de-açúcar pode ser estimada pela Equação 3.

$$\text{Atividade Enzimática (U/g)} = -106,2717 + 61,5462 \times \text{Indutor} - 4,3987 \times \text{Indutor}^2 - 0,0076 \times \text{Temperatura}^2$$

A superfície de resposta considerando apenas os efeitos significativos são apresentados na Figura 8.

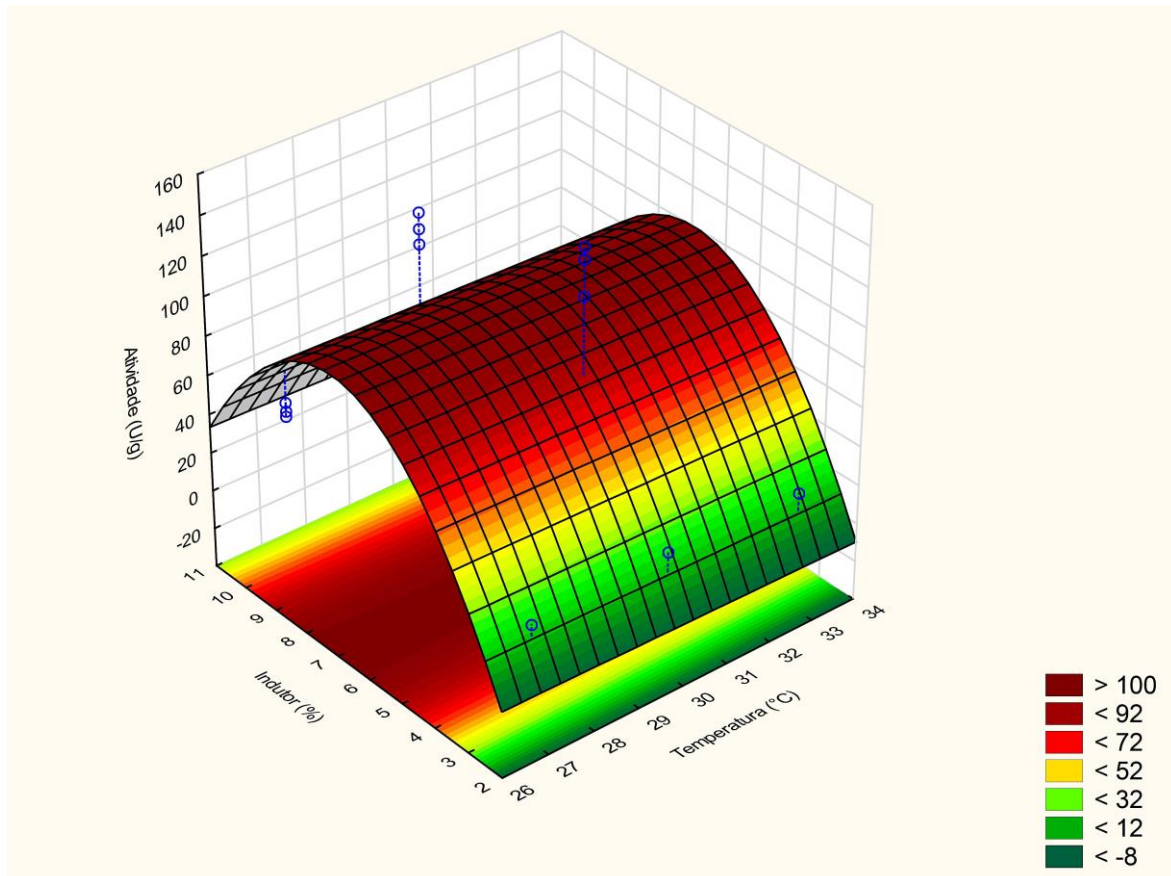


Figura 8: Superfície de resposta para a produção enzimática do *Penicillium sp.* com bagaço de cana-de-açúcar.

5.3.2 Análise estatística da produção enzimática de *Penicillium sp.* utilizando fibra de côco

A análise dos principais efeitos e interações das variáveis para a produção enzimática com o uso do *Penicillium sp.* e a fibra de côco pode ser observada na Tabela 12.

Tabela 12: Estimativas dos efeitos para a produção enzimática de *Penicillium sp.* com fibra de côco.

Fator	Efeito	Erro padrão	t(17)	p	Coefficiente
Intercepto	44,5396	4,937754	9,02022	0,000000	44,5396
Capacidade de campo (%) (L)	11,7659	4,305830	2,73254	0,014177	5,8829
Capacidade de campo (%) (Q)	-7,1914	7,392207	-0,97283	0,344278	-3,5957
Indutor (%) (L)	31,8210	4,267892	7,45590	0,000001	15,9105
Indutor (%) (Q)	-12,7315	8,468837	-1,50333	0,151103	-6,3657
Temperatura (°C) (L)	8,5880	4,305830	1,99450	0,062388	4,2940
Temperatura (°C) (Q)	-21,6358	7,392207	-2,92684	0,009411	-10,8179
1L by 2L	-2,1627	5,132890	-0,42134	0,678785	-1,0813
1L by 3L	-0,1389	5,227079	-0,02657	0,979111	-0,0694
2L by 3L	7,0139	5,132890	1,36646	0,189598	3,5069
R ajustado = 0,72752					
(L) Linear					
(Q) Quadrática					

Nota-se que a Capacidade de campo (L), o Indutor (L) e a Temperatura (Q) foram significativas no intervalo de confiança de 95%. Para os demais fatores e interações, o p valor foi maior que 0,05 e, com isso, estes fatores foram eliminados do modelo e considerados erros aleatórios experimentais. Isto também pode ser verificado no Gráfico de Pareto (Figura 9).

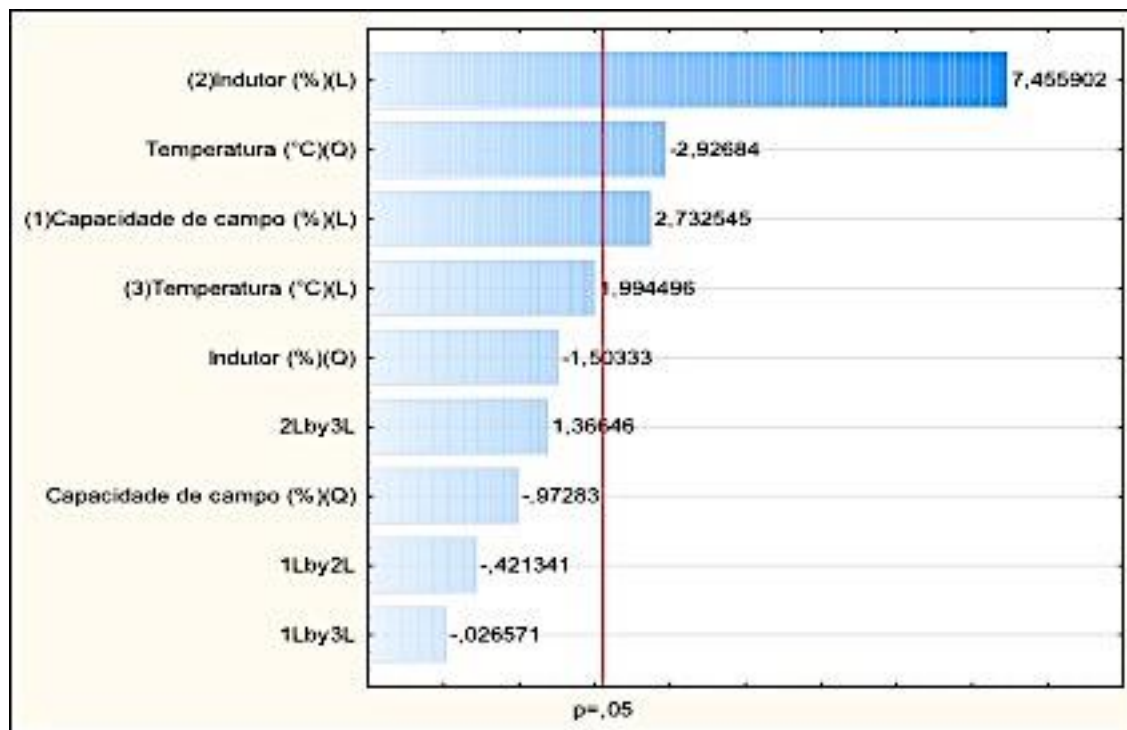


Figura 9: Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis da produção enzimática de *Penicillium sp.* com Fibra de côco com 95% de confiança.

A análise da variância (ANOVA) com os fatores significativos é mostrada na Tabela 13.

Tabela 13: Análise da variância (ANOVA) para a produção enzimática de *Penicillium sp.* com fibra de côco.

Fator	Soma	Graus de	Média	F	p
Capacidade de campo (%)(L)	648,667	1	648,667	7,11018	0,013786
Indutor (%)(L)	4372,098	1	4372,098	47,92353	0,000000
Temperatura (°C)(Q)	702,162	1	702,162	7,69655	0,010788
Erro	2098,307	23	91,231		
Total	7821,233	26			

R = 0,81219

A Figura 10 apresenta a comparação entre os valores observados no experimento e os valores preditos pelo modelo.

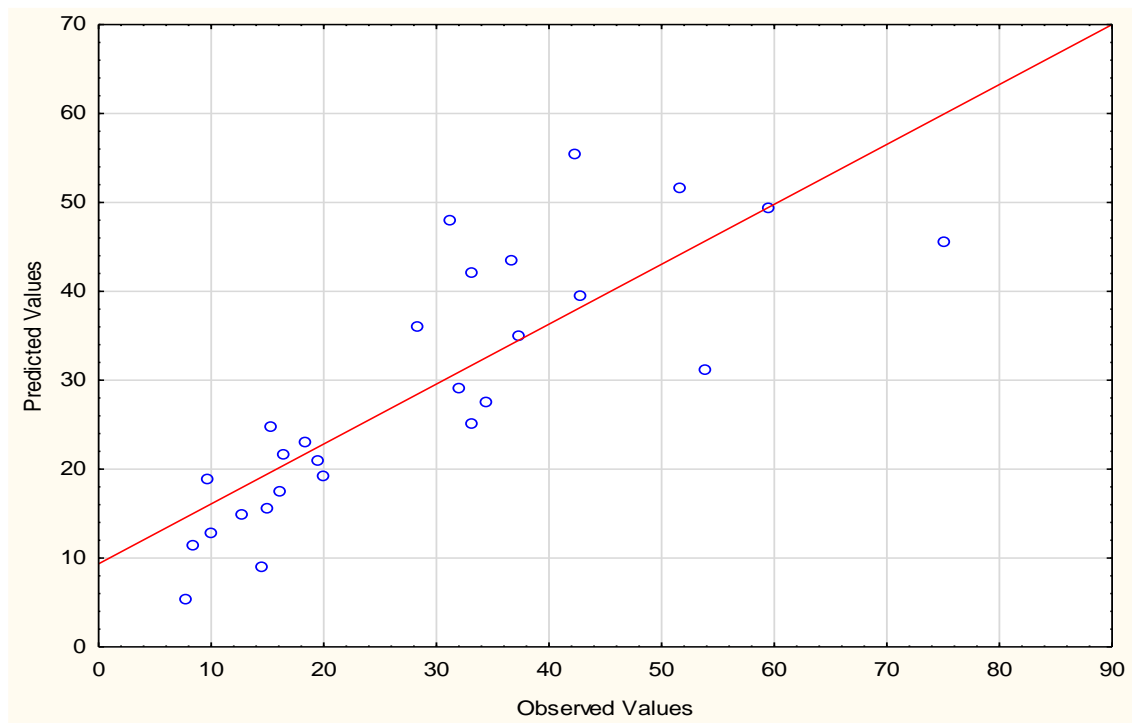


Figura 10: Valores preditos versus valores experimentais da produção enzimática do *Penicillium sp.* com fibra de côco.

Com base nos valores estatisticamente significativos observados, a produção enzimática de *Penicillium sp.* com fibra de côco pode ser estimada pela Equação 4.

$$\text{Atividade Enzimática (U/g)} = - 31,8613 + 0,3001 \times \text{Capacidade de campo} + 4,0811 \times \text{Indutor} + 18,6046$$

A superfície de resposta considerando apenas os efeitos significativos são apresentados na Figura 11.

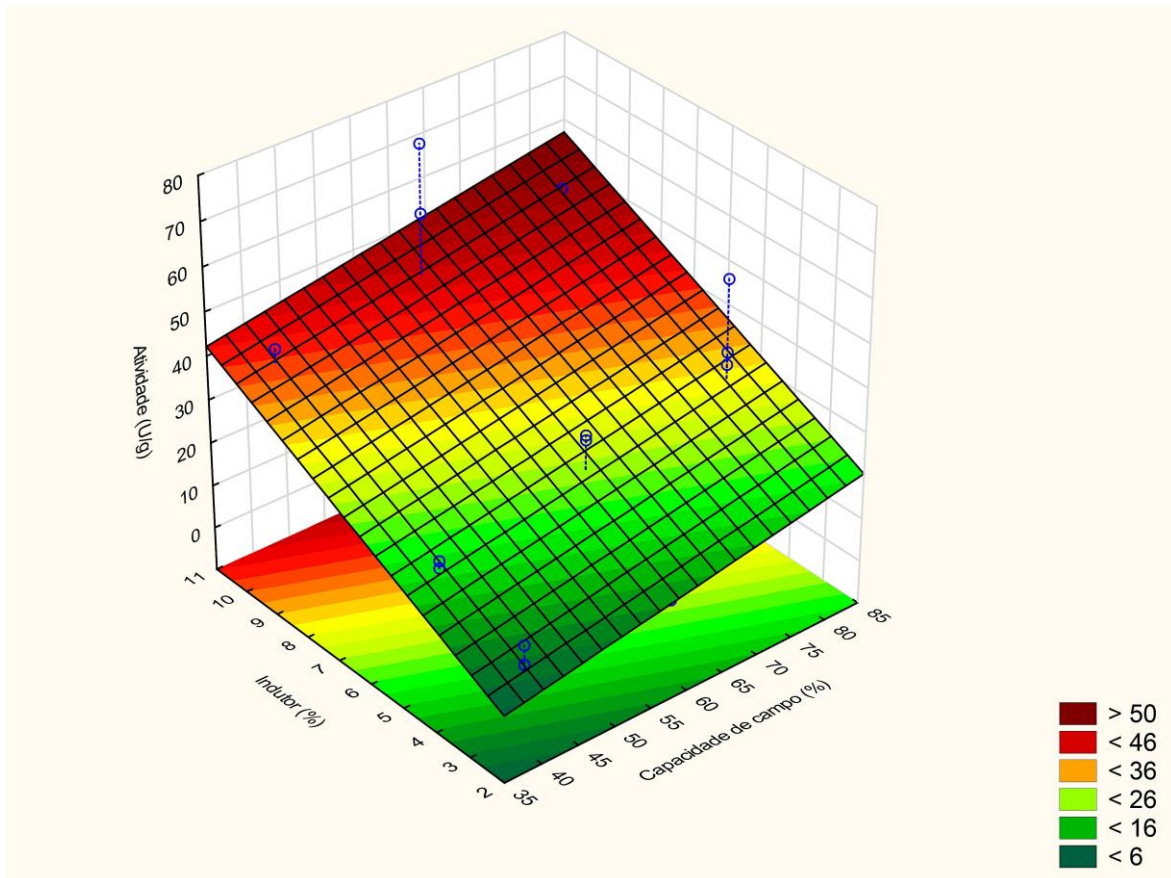


Figura 11: Superfície de resposta para a produção enzimática do *Penicillium sp.* com fibra de côco.

5.3.3 Análise estatística da produção enzimática de *Rhizomucor sp.* utilizando bagaço de cana-de-açúcar

A análise dos principais efeitos e interações das variáveis para a produção enzimática com o uso do *Rhizomucor sp.* e o bagaço de cana-de-açúcar pode ser observada na Tabela 14.

Tabela 14: Estimativas dos efeitos para a produção enzimática de *Rhizomucor* sp. com bagaço de cana-de-açúcar.

Fator	Efeito	Erro padrão	t(17)	p	Coeficiente
Intercepto	143,324	12,37498	11,58176	0,000000	143,3241
Capacidade de campo (%) (L)	4,895	10,79125	0,45359	0,655858	2,4474
Capacidade de campo (%) (Q)	-12,111	18,52632	-0,65372	0,522034	-6,0556
Indutor (%) (L)	61,926	10,69618	5,78954	0,000022	30,9630
Indutor (%) (Q)	-101,222	21,22457	-4,76911	0,000178	-50,6111
Temperatura (°C) (L)	-0,090	10,79125	-0,00837	0,993423	-0,0451
Temperatura (°C) (Q)	-108,778	18,52632	-5,87153	0,000018	-54,3889
1L by 2L	-9,946	12,86403	-0,77320	0,450024	-4,9732
1L by 3L	-0,806	13,10009	-0,06149	0,951684	-0,4028
2L by 3L	-18,146	12,86403	-1,41059	0,176403	-9,0729
R ajustado = 0,74601					
(L) Linear					
(Q) Quadrática					

Nota-se que o Indutor (L) e (Q) e a Temperatura (Q) foram significativas no intervalo de confiança de 95%. Para os demais fatores e interações, o p valor foi maior que 0,05 e, com isso, estes fatores foram eliminados do modelo e considerados erros aleatórios experimentais. Isto também pode ser verificado no Gráfico de Pareto (Figura 12).

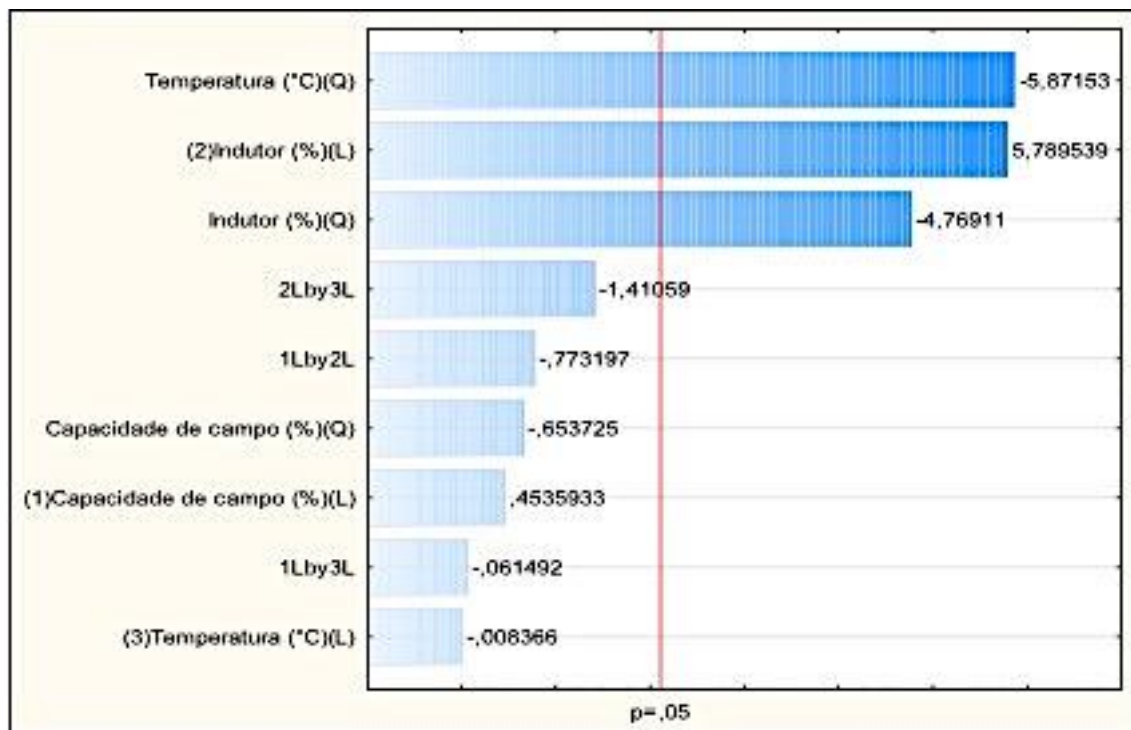


Figura 12: Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis da produção enzimática de *Rhizomucor sp.* com Bagaço de cana-de-açúcar com 95% de confiança.

A análise da variância (ANOVA) com os fatores significativos é mostrada na Tabela 15.

Tabela 15: Análise da variância (ANOVA) para a produção enzimática de *Rhizomucor sp.* com Bagaço de cana-de-açúcar.

Fator	Soma	Graus de	Média	F	p
Indutor (%)(L)	17256,69	1	17256,69	37,85420	0,000003
Indutor (%)(Q)	11709,64	1	11709,64	25,68622	0,000039
Temperatura (°C)(Q)	17748,91	1	17748,91	38,93393	0,000002
Erro	10485,07	23	455,87		
Total	52701,33	26			

A Figura 13 apresenta a comparação entre os valores observados no experimento e os valores preditos pelo modelo.

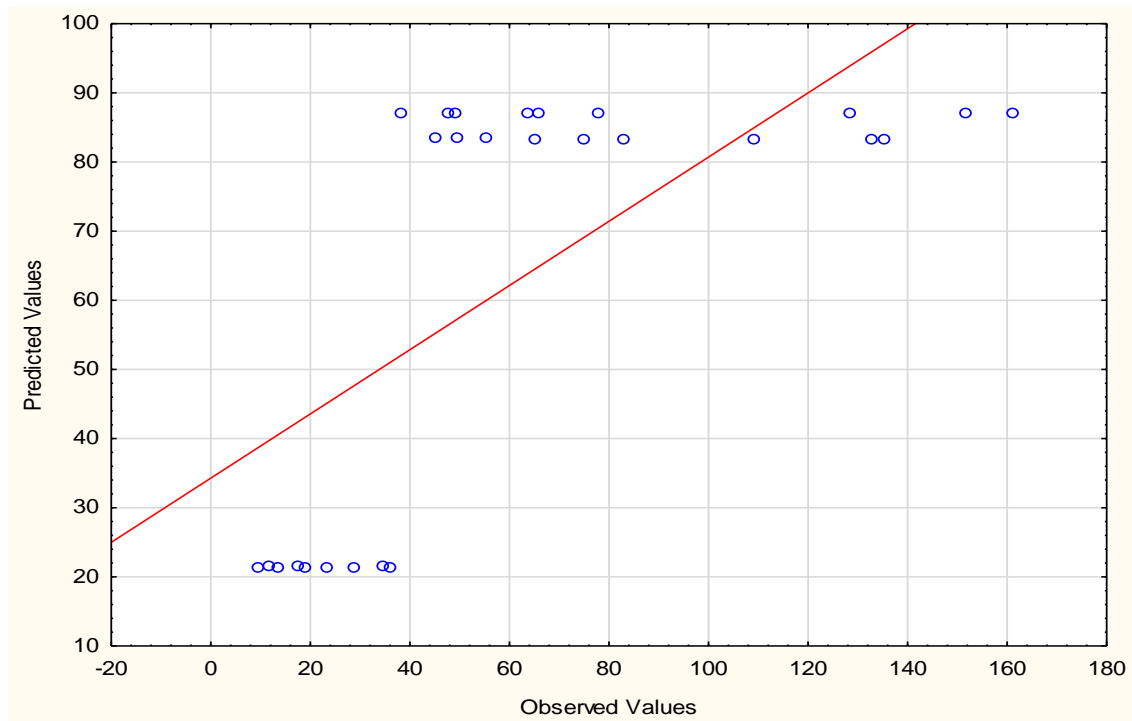


Figura 13: Valores preditos versus valores experimentais da produção enzimática do *Rhizomucor sp.* com Bagaço de cana-de-açúcar.

Com base nos valores estatisticamente significativos observados, a produção enzimática de *Rhizomucor sp.* com bagaço de cana-de-açúcar pode ser estimada pela Equação 5.

$$\text{Atividade Enzimática (U/g)} = - 89,4476 + 53,2444 \times \text{Indutor} - 3,5990 \times \text{Indutor}^2 + 0,0003 \times \text{Temperatura}^2$$

A superfície de resposta considerando apenas os efeitos significativos são apresentados na Figura 14.

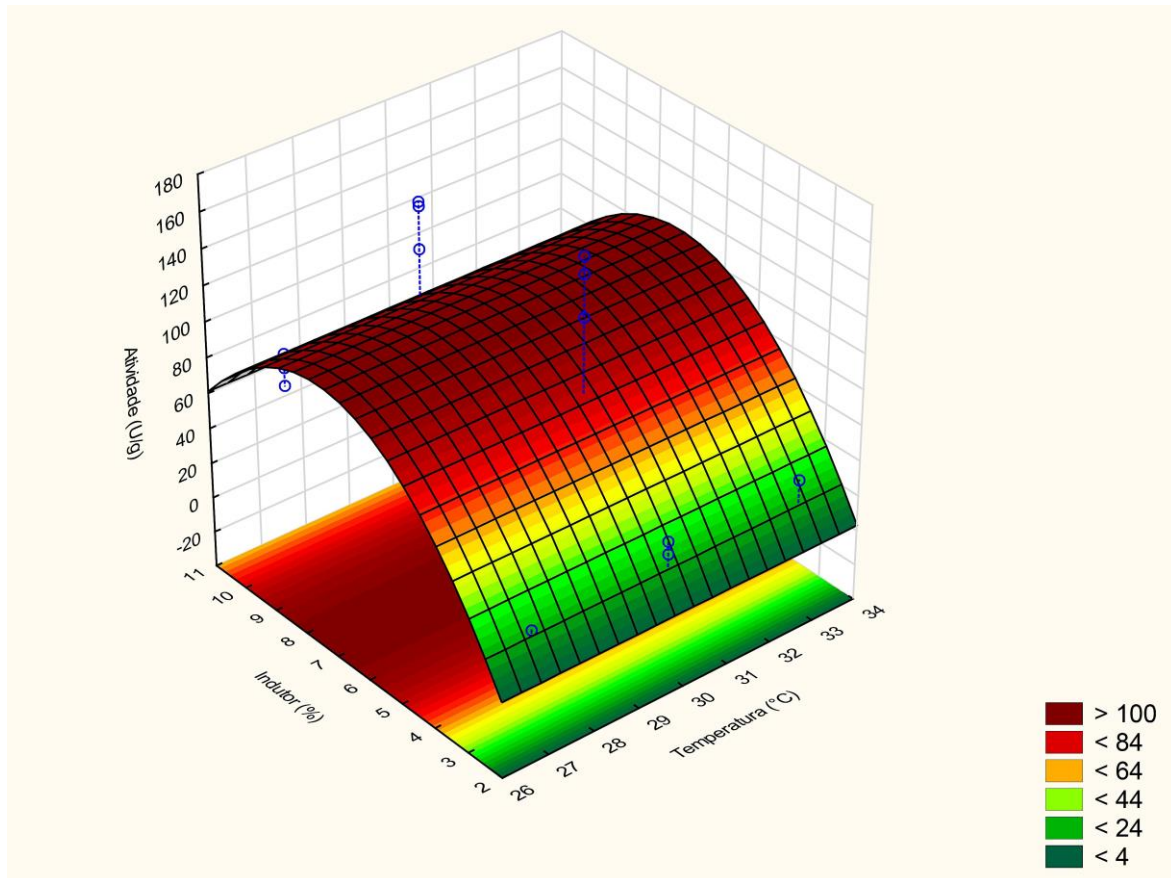


Figura 14: Superfície de resposta para a produção enzimática do *Rhizomucor sp.* com bagaço de cana-de-açúcar.

5.3.4 Análise estatística da produção enzimática de *Rhizomucor sp.* utilizando fibra de côco

A análise dos principais efeitos e interações das variáveis para a produção enzimática com o uso do *Rhizomucor sp.* e o fibra de côco pode ser observada na Tabela 16.

Tabela 16: Estimativas dos efeitos para a produção enzimática de *Rhizomucor sp.* com fibra de côco.

Fator	Efeito	Erro padrão	t(17)	p	Coeficiente
Intercepto	48,9866	5,097061	9,61076	0,000000	48,9866
Capacidade de campo (%) (L)	11,3724	4,444750	2,55860	0,020346	5,6862
Capacidade de campo (%) (Q)	-6,9753	7,630703	-0,91411	0,373442	-3,4877
Indutor (%) (L)	31,9753	4,405588	7,25790	0,000001	15,9877
Indutor (%) (Q)	-13,7963	8,742068	-1,57815	0,132957	-6,8981
Temperatura (°C) (L)	10,6878	4,444750	2,40460	0,027866	5,3439
Temperatura (°C) (Q)	-23,2716	7,630703	-3,04973	0,007243	-11,6358
1L by 2L	-1,5377	5,298494	-0,29021	0,775163	-0,7688
1L by 3L	0,3241	5,395722	0,06006	0,952807	0,1620
2L by 3L	6,7460	5,298494	1,27320	0,220083	3,3730
R ajustado = 0,72199					
(L) Linear					
(Q) Quadrática					

Nota-se que a Capacidade de campo (L), o Indutor (L) e a Temperatura (L) e (Q) foram significativas no intervalo de confiança de 95%. Para os demais fatores e interações, o p valor foi maior que 0,05 e, com isso, estes fatores foram eliminados do modelo e considerados erros aleatórios experimentais. Isto também pode ser verificado no Gráfico de Pareto (Figura 15).

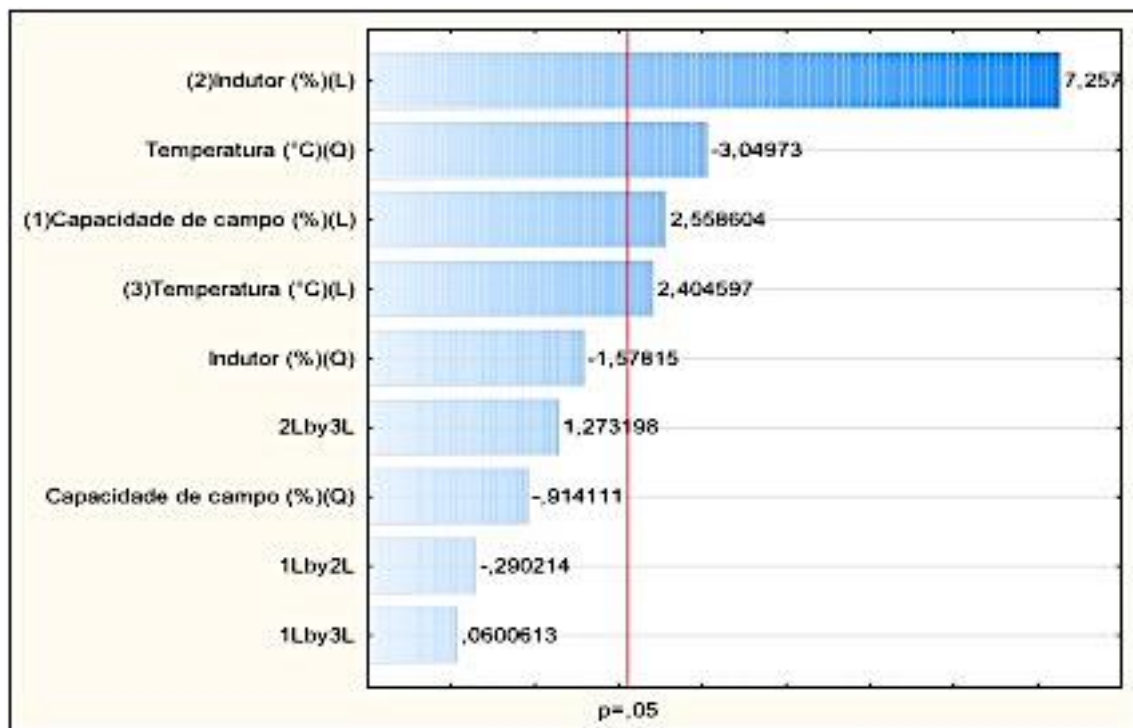


Figura 15: Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis da produção enzimática de *Rhizomucor sp.* com Fibra de côco com 95% de confiança.

A análise da variância (ANOVA) com os fatores significativos é mostrada na Tabela 17.

Tabela 17: Análise da variância (ANOVA) para a produção enzimática de *Rhizomucor sp.* com Bagaço de cana-de-açúcar.

Fator	Soma	Graus de	Média	F	p
Capacidade de campo (%) (L)	599,606	1	599,606	6,85416	0,015704
Indutor (%) (L)	4387,226	1	4387,226	50,15092	0,000000
Temperatura (°C) (L)	444,462	1	444,462	5,08069	0,034490
Temperatura (°C) (Q)	812,351	1	812,351	9,28609	0,005908
Erro	1924,571	22	87,480		
Total	8168,216	26			

R = 0,72154

A Figura 16 apresenta a comparação entre os valores observados no experimento e os valores preditos pelo modelo.

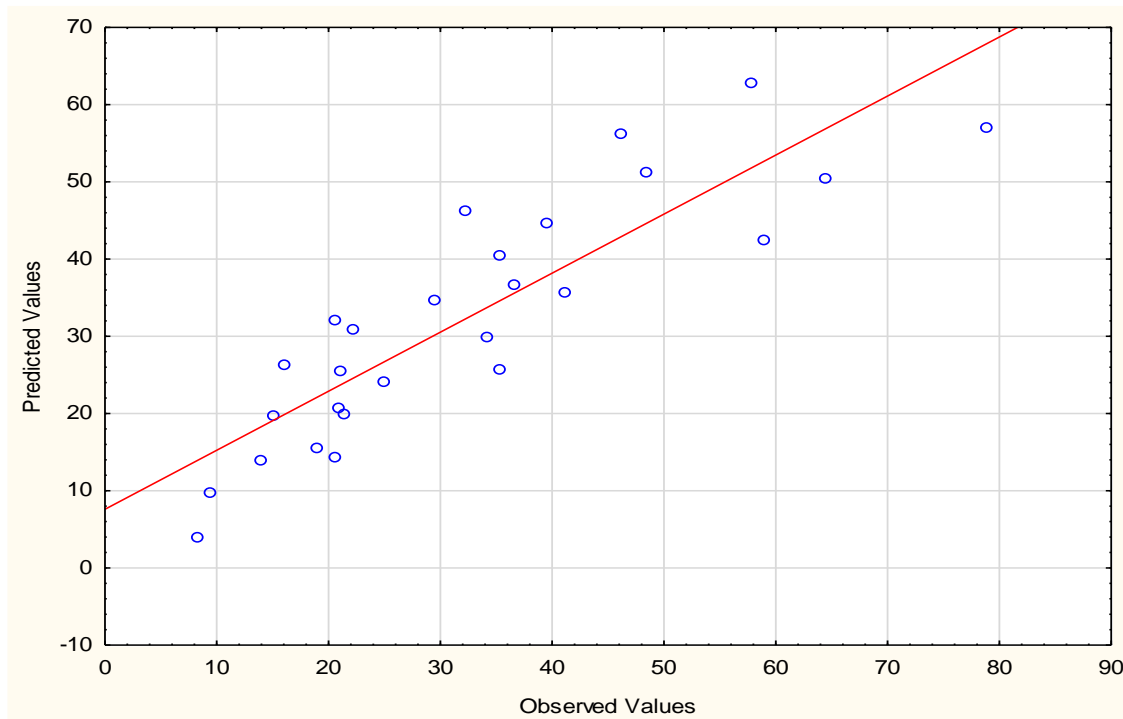


Figura 16: Valores preditos versus valores experimentais da produção enzimática do *Rhizomucor sp.* com Fibra de côco.

Com base nos valores estatisticamente significativos observados, a produção enzimática de *Rhizomucor sp.* com fibra de côco pode ser estimada pela Equação 6.

$$\text{Atividade Enzimática (U/g)} = - 1214,4032 + 0,2885 \times \text{Capacidade do campo} + 4,0881 \times \text{Indutor} + 1231,2716$$

A superfície de resposta considerando apenas os efeitos significativos são apresentados na Figura 17.

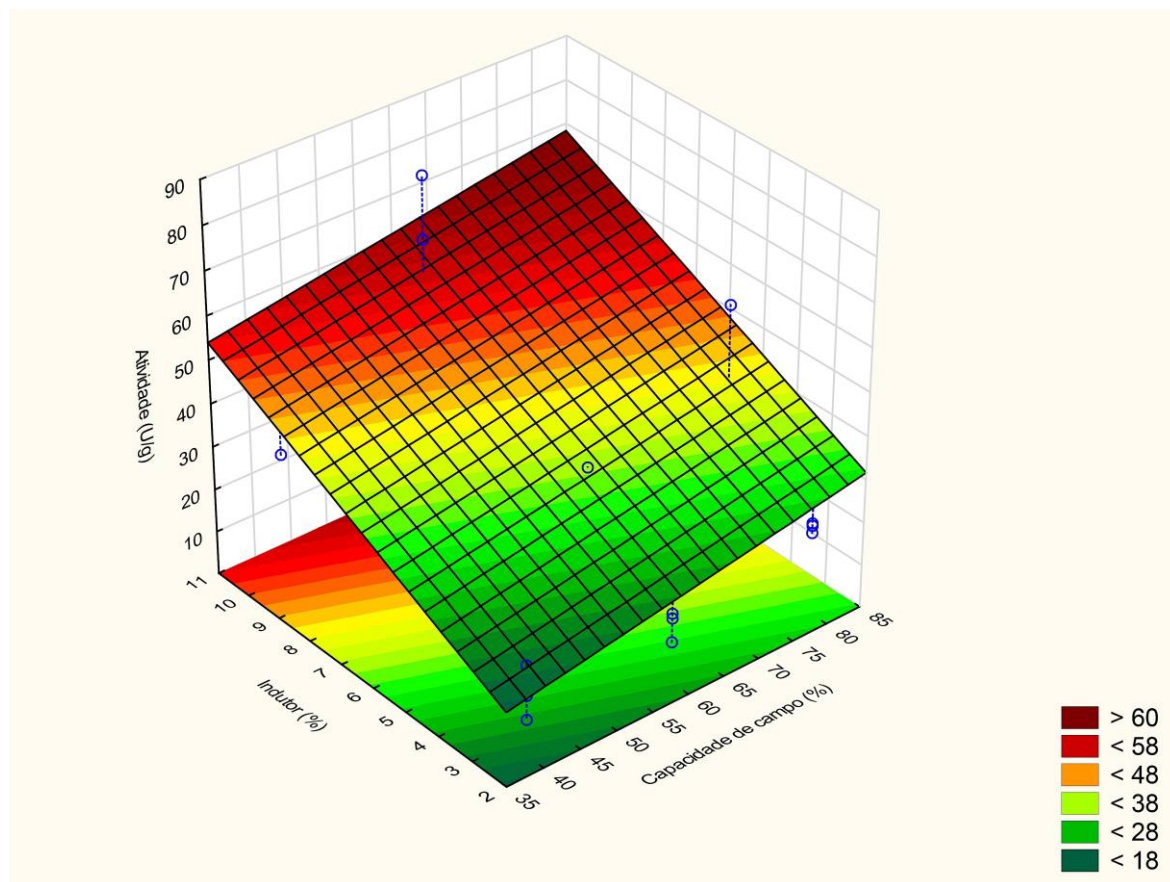


Figura 17: Superfície de resposta para a produção enzimática do *Rhizomucor sp.* com fibra de côco.

6. CONCLUSÕES

Os fungos *Penicillium sp.* e *Rhizomucor sp.* produziram lipases por Fermentação em Estado Sólido (FES) tendo como meio de suporte, bagaço de cana-de-açúcar e fibra de côco, e, como indutor, o óleo de soja, conforme os parâmetros utilizados.

Com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar como meio de suporte, o *Penicillium sp* apresentou a maior atividade lipásica (147,5 U/g) nas condições de 30°C de temperatura, 60% de Capacidade de campo e 5% do indutor, com a Concentração do indutor e a Temperatura com influência significativa nos resultados. O *Rhizomucor sp* apresentou a maior atividade lipásica (161,3 U/g) nas mesmas condições acima citadas e com a mesma influência significativa nos resultados.

Para a fibra de côco, o *Penicillium sp* apresentou a maior atividade lipásica (75 U/g) nas condições de 30°C de temperatura, 60% de umidade e 10% do indutor, com a Capacidade do campo, Concentração do indutor e Temperatura com influência significativa nos resultados. O *Rhizomucor sp* apresentou a maior atividade lipásica (78,9 U/g) nas mesmas condições acima citadas e com a mesma influência nos resultados.

Ambos os substratos, bagaço de cana-de-açúcar e fibra de côco, foram viáveis para a sua utilização em fermentações no estado sólido com a finalidade de se produzir lipases com fungos estudados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, E. M. Production of 11 α -hydroxyprogesterone using *Aspergillus terreus* immobilized on polytetrafluoroethylene. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38, 224, 2007.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, 34, 1185, 2009.

ALONSO, F.O.M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica***. Rio de Janeiro: 2001. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. AOCS. Official Method Ca-5a-40- Free Fatty Acids. 2 p. 1997.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM. Annual Book of ASTM, Section 5 – Petroleum products, Lubricants and Fossil Fuels. 2001.

APHA (2012). **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 22nd ed. Washington.

BAN, K.; HAMA, S; NISHIZUKA, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 157–165, 2002.

BROZZOLIA, V., CROGNALE, S., SAMPEDRO, FEDERICI, F. D'ANNIBALE, A., PETRUCCIOLI, M. Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. **Bioresource Technology**, V. 100, p. 3395-3402, 2009.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 17, p. 2195–2210, 2006.

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*

restrichum in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 4, pp. 239–247, 2000.

CHEN, J.-P.; LIN, G.-H. Optimization of Biodiesel Production Catalyzed by Fungus Cells Immobilized in Fibrous Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 161, 181, 2010.

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

COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**. 101 v. 8308–14 p. 2010.

CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAÏLI- ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive oil cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, p. 75-78, 1998.

CORTEZ, Daniela V.; CASTRO, Heizir F. de e ANDRADE, Grazielle S. S.. Potential catalytic of mycelium-bound lipase of filamentous fungi in biotransformation processes. **Química Nova** [online]. 2017, vol.40, n.1, pp.85-96.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry- A review. **Journal of Food Engineering**. v. 22 (3), p. 211-219, 2005.

D'ANNIBALE, A.; SERMANNI, G. G.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology** , 97, 1828, 2006.

DAIHA KDG, ANGELI R, DE OLIVEIRA SD, ALMEIDA RV. Are Lipases Still Important Biocatalysts? A Study of Scientific Publications and Patents for Technological Forecasting. **PLoS ONE** 10(6): e0131624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131624>, 2015.

DALSENTER, F.D.H.; VICCINI, G.; BARGA, M.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. A mathematical model describing the effect of temperature variations on the

kinetics of growth in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 40, 801-807, 2005.

DAMASO, M.C.T.; PASSIANOTO, M.A.; FREITAS, S.C.; FREIRE, D.M.G.; LAGO, R.C.A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid- state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 676-681, 2008.

DE MARIA, P.D.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; ALCANTARA, A.R. Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p.180-196, 2006.

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

DI LUCCIO, M.; CAPRA, F.; RIBEIRO, N.P. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, p. 173-180, 2004.

ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; THAER TALED, A.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 39, 525-528, 2004.

FREIRE, D.M.G. **Seleção de microrganismos lipolíticos e produção de lipase por *Penicillium restrictum***. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 1996.

FREIRE, D.M.G., GOMES, P.M., BON, E.P.S. et al. Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*,. **Journal of the Brazilian Society of Microbiology**, v.28(1), pp. 6-12. 1997.

GOMBERT, A.K., LOPES, A., CASTILHO, L.R. et al, Lipase production by *Penicillium restrictum* in a solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, v. 35, pp. 85-90. 1999.

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

GUPTA, R.; GUPTA, N; RATHI, P. Bacterial lipases - an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 64, pp. 763-781, 2004.

GUTARRA, M.L.E. **Produção de Lipase por Fermentação no Estado Sólido: Seleção de Fungos Produtores e Estudo das Condições de Cultivo**. Dissertação de Mestrado em Ciências dos Alimentos, UFRJ/IQ. Rio de Janeiro, 2003.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.

IFTIKHAR, T.; NIAZ, M.; ZIA, M.A.; UL HAQ, I. Production of extracellular lipases by *Rhizopus oligosporus* in a stirred fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1124-1132, 2010.

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

JAEGER, K.E., REETZ, M.T., DIJKSTRA, B.W. Bacterial Biocatalysts - Molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology** 53, pp. 315-403, 1999.

JAEGER, K.E.; KHARAZ MI, A.; HOIBY N. Extracellular lipase of *P. aeruginosa* biochemical characterization and effects on human neutrophil and monocyte function in vitro. **Microbiology Pathology**, v. 10, p. 173-182, 1991.

JAEGER, K.-E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Review**, v. 151, n.1, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K-E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G.; SHRIVASTAVA, N. Standard review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**. Rev. 2 v. 039–48 p. 2007.

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

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.

KHAN, N.R.; RATHOD, V.K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochemistry**, 50, 1793, 2015.

KUMAR, S.; KATIYAR, N.; INGLE, P.; NEGI, S. Use of evolutionary operation (EVOP) factorial design technique to develop a bioprocess using grease waste as a substrate for lipase production. **Bioresource Technology**, 102, 4909, 2011.

KUMAR, S.; MATHUR, A.; SINGH, V.; NANDY, S.; KHARE, S. K.; NEGI, S. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. **Bioresource Technology**, 120, 300, 2012.

LI, W.; DU, W.; LIU, D. *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell catalyzed methanolysis of crude and acidified rapeseed oils for biodiesel production in tert-butanol system. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1481-1485, 2007.

LIMA JUNIOR, A.F. **Biodegradação e atividade lipolítica em resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental**. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental). Vitória-ES: UFES, 2009.

LIU, G., LU, S., JIANG, Y., WU, Y., Production and characteristics of thermostable lipolytic enzymes from *Monascus fuliginosus*. **Weishengwu Xuebao.**, v. 35 (2), p.109-114, 1995.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**. 3 v. 193–217 p. 1985.

MAHADIK, N.D.; BASTAWDE, K.B.; PUNTAMBEKAR, U.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v.39, n. 12, p. 2031–2034, 2004.

MAHADIK, N. D., PUNTAMBEKAR, U. S., BASTAWDE, K. B., KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, 38(5), 715-721, 2002.

MAIA, M.M.D.; HEASLEY, A; CAMARGO ,DE M.M.; 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. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 23-27, 2001.

MARTINS, T. S. **Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682**. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2001.

MENDES, A. A., CASTRO, H. F., PEREIRA, E. B.; FURIGO JÚNIOR, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305. 2005.

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

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. **Bioresource Technology**, 69, 145, 1999.

MITCHELL, D.A. BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. The bioreactor Step of SSF. A Complex Interaction of Phenomena. In: **Solid-State Fermentation Bioreactors**. Ed.Springer, p.13-32, Heidelberg, 2006.

NAGY, V.; TOKE, E. R.; KEONG, L. C.; SZATZKER, G.; IBRAHIM, D.; OMAR, I. C.; SZAKÁCS, G.; POPPE, L. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 141-148, 2006.

NING LI; MIN-HUA ZONG. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. V. 66. 43 – 54, 2010.

OLIVEIRA, L.G.; MANTOVANI, S.M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.

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. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 84-86, p. 1137-1145, 2000.

PANDEY, A. Solid State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal** 13, pp. 81–84, 2003.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**. 77 v. 149–62 p. 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; SINGH-NEE NIGAM, P. Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. **New Delhi: Asiatech**, 221 p, 2001.

PATEL, R. N. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 804-826, 2002.

PETERS, I.I.; NELSON, F.E. Factors influencing the production of lipase by *Mycotorula lipolytica*. **Journal of Bacteriology**, v. 55, n. 5, p. 581-591, 1948.

PIMENTEL, M.C.B. **Produção de lipases por fungos filamentosos: estudos cinéticos e síntese de ésteres**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1996.

PINHEIRO, T.L.F. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo**. Tese (Doutorado) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2006.

POLIZELLI, P. P.; FACCHINI, F. D. A.; CABRAL, H.; RODRIGUEZ, F. O. B. A New Lipase Isolated from Oleaginous Seeds from *Pachira aquatica*

(Bombacaceae). **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 150 v. 233-242 p. 2008.

PUTHLI, M.S.; RATHOD, V.K.; PANDIT, A.B. Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 287- 294, 2006.

RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A.K.; NAMPOOTHIRI, K.M.; FRANCIS, F.; NAGY, V.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Coconut oil cake- a potencial raw material for the production of @-amylase. **Bioresource Technology**, v. 93, p 169-174, 2004.

RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, 2005.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Evaluation of medium components by Plackett–Burman statistical design for lipase production by *Candida rugosa* and kinetic modeling. **Chinese Journal of Biotechnology**. 24 v. 436–44 p. 2008.

RANGANATHAN, S.V.; NARASIMHAN, S.L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymathic production of biodiesel. **Biosource Technology**, vol.99, nº10, pp 3975-3981, 2008.

RIBEIRO, B. D., CASTRO, A. M. D., COELHO, M. A. Z., FREIRE, D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme research**, 2011.

RIGO, E. **Aplicação de lipases como auxiliar no pré-tratamento de efluentes de frigoríficos de suínos e bovinos**. Erechim: URI. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos), 2004.

RIGO, E. **Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja**. Florianópolis: UFSC. (Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos), 2009.

RIGO, E.; NINOW, J. L.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R. Improved lípase biosynthesis by a newly isolated *Penicillium* sp. grown on agricultural wastes. **Industrial Biotechnology**. 5 v. 119–26 p. 2009.

RODRIGUES, C. **Seleção de fungos produtores de lipases a partir de resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental.** 2011. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.

ROVEDA, M. **Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa.** Passo Fundo: UPF. (Dissertação de Mestrado em Engenharia), 2007.

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

SAIFUDDIN, N.; CHUA, K. H. Biodegradation of lipid-rich wastewater by combination of microwave irradiation and lipase immobilized on chitosan. **Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 315-323, 2006.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 69 v. 66–73 p. 2011.

SANT'ANNA Jr., G.L. Produção de Enzimas Microbianas. In: BORZANI, W.; SCHIMIDEL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Eds.). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Ed. Edgar Blücher, 2001. p. 351-362.

SATTARI, S.; VAHABZADEH, F.; AGHTAEI, H. K. Performance of loofa-immobilized *rhizopus oryzae* in the enzymatic production of biodiesel with use of oleic acid in n-hexane medium **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 32, 367, 2015.

SAXENA, R.K.; GHOSH, P.K.; GUPTA R.; YADAV, R.P.; DAVIDSON, S. Microbial lipases - production and applications. **Science Progress**, vol.72, pp 119-157, 1996.

SAXENA, R.K., DAVIDSON, W. S., SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**. 39(2), 239-247, 2003.

SAXENA, R.K; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, 52(1), 1-18, 2003.

SEMIONATO,S. **Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura.** (Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental). Vitória: UFES, 2006.

Salihua, A.; Alam, Md.Z.; AbdulKarima, M.I.; Salleh, H.M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, 2011.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E.; SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**. 40. 2885-2889. 2005.

SINGH, S.P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as biodiesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.12, n. 1, p. 200-216, 2010.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. 44 v. 13–8 p. 2009.

SHARMA, R., CHISTI, Y. BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances** 19, pp. 627-662, 2001.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A., TOMINAGA, Y., Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 133-142, 2002.

SHRESTHA, P.; KHANAL, S. K., POMETTO III, A. L., VAN LEEUWEN, J. Enzyme production by wood-rot and soft-rot fungi cultivated on corn fiber followed by simultaneous saccharification and fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4156-4161, 2009.

SUN, S.Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for 'whole-cell synthetic lipase' production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**. 43. 219–24. 2008.

SUN, T.; DU, W.; ZENG, J.; DAI, L.; LIU, D. Exploring the effects of oil inducer on whole cell-mediated methanolysis for biodiesel production **Process Biochemistry**., 45, 514, 2010.

TAN, T.; ZHANG, M.; XU, J.; ZHANG, J. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, 39, 1495, 2004.

TENG, Y.; XU, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method **Bioresource Technology**., 99, 3900, 2008.

UEDA, M. TAKAHASHI, S.; WASHIDA, M.; SHIRAGA, S.; TANAKA, A. Expression of *Rhizopus oryzae* lipase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 17:113–24, 2002.

UL-HAQ, I.; IDRESS, S.; RAJOKA, M.I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 637-641, 2002.

VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**. 9 v. 69–81 p. 2006.

VARGAS, G.D.L.P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato**. Tese (Mestrado) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2004.

WILKINSON, B.; BACHMANN, B.O. Biocatalysis in pharmaceutical preparation and alteration. **Current opinion in chemical biology**, v. 10, n. 2, p. 169-176, 2006.

WOLSKI, E. **Estudo comparativo da produção de lípase por fermentação submersa utilizando *Penicillium* sp. livre e imobilizado**. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos). Erechim: URI, 2008.

XU, Y.; WANG, D.; MU, X. Q.; ZHAO, G. A.; Zhang, K. C. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 18, p. 29-37, 2002.

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; Tan, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, 40, 2095, 2005.

ZHANG, Z. Q.; GUAN, C. Y. The screening and culture condition research on lipase producing microorganisms capable of catalyzing the reaction of biodiesel production. **China Fats**. 34 v. 41-45 p. 2009.