



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

TATIELLE PEREIRA SILVA

**PRODUÇÃO, PRÉ-PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
LIPASE PRODUZIDA POR *Penicillium roqueforti* DURANTE A
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO FARELO DE CACAU**

ILHÉUS – BAHIA

JULHO/2016

TATIELLE PEREIRA SILVA

**PRODUÇÃO, PRÉ-PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
LIPASE PRODUZIDA POR *Penicillium roqueforti* DURANTE A FERMENTAÇÃO
EM ESTADO SÓLIDO DO FARELO DE CACAU**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química. Área de concentração: Produtos Naturais.

Orientador: Prof^o DSc. Marcelo Franco

ILHÉUS – BA

JULHO/2016

S586

Silva, Tatielle Pereira.

Produção, pré-purificação, caracterização e aplicação de lipase produzida por *Penicillium roqueforti* durante a fermentação em estado sólido do farelo de cacau / Tatielle Pereira Silva. – Ilhéus, BA: UESC, 2016.

iv, 77f. : il.

Orientador: Marcelo Franco.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências.

1. Fermentação. 2. Farelo de cacau. 3. Lipase. 4. Resíduos agrícolas – Reaproveitamento. I. Título.

CDD 547.29

TATIELLE PEREIRA SILVA

**PRODUÇÃO, PRÉ-PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
APLICAÇÃO DE LIPASE PRODUZIDA POR *Penicillium
Roqueforti* DURANTE A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
DO FARELO DO CACAU**

Ilhéus-BA, 22 de julho de 2016.

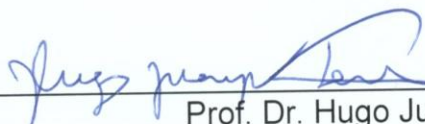
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marcelo Franco
Doutor em Química - UFRJ
Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC
(Orientador)



Profa. Dra. Julieta Rangel de Oliveira
Doutora em Ciências - USP
Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC



Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira
Doutor em Bioquímica - USP
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Ao Rei dos Reis, meu Deus, por seu infinito amor e fidelidade todos os dias de minha vida.

Aos meus anjos na Terra, minha família, que nunca me abandonaram e sempre me incentivaram a chegar mais longe.

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui não foi tão fácil, mas com certeza foi gratificante, pois pude contar com o apoio de muitos e a estes vão os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar ao dono da vida, aquele que me deu o respirar e a capacidade de ser um ser humano melhor. Ao Deus que tudo pode e que é maravilhoso e que sempre escuta minhas orações e que ao acordar todos os dias me impulsiona a querer ser mais e melhor. Obrigada papai por tudo.

Aos meus avós, Abiel e Anita, pela criação, amor, conselhos e por nunca terem desistido de mim. A minha mamãe Selma pelo amor incondicional, por sempre abrir mão de seus sonhos para sonhar os meus. A minha irmã Maiane, por sempre ter acreditado em mim e por ter me dado minha linda e amável sobrinha Maria Cecília, quem tem alegrado cada vez mais meus dias.

Aos familiares, tios, tias, primos, primas e em especial minha tia Celeste que sempre esteve em oração por mim. Meu muito obrigada!

Ao meu noivo Wilton por seu amor, e apoio em todos os momentos. Aos meus amigos que desde a graduação nunca me abandonaram e sempre me apoiaram mesmo de longe, Rose, Luís Fernando, Thati, Nathi, Cleici.

A galera da república mais top de Itabuna, Ane, Analu, Mayara, Luana, Guega, Ione, Léa, por terem sido um porto seguro, pessoas maravilhosas que estarão para sempre em meu coração. Muito obrigada família!

Aos meus amigos da turma de Mestrado e companheiros do LABIOCAT e LABRA, Lorena, Denize, Gabriel, Aila, Nadabe, Nati, Alê, Lucas, José Lucas, Edvan, Guega, Maiara, Francly, George, Nívio, Dhedheu, Sabrina, por estarem sempre dispostos a me ajudar. As meninas da Agroindústria, Poly, Elck, Pri, Renatinha, por todo apoio desde a minha chegada à UESC. Ao pessoal do CBG- Laboratório de Genômica e Proteômica, em especial a Horlei que sempre esteve receptivo e disposto a me ajudar. Aos novos amigos do LAMP (UFAL).

Ao meu orientador Professor Marcelo Franco, pela confiança, pelos ensinamentos, profissionalismo, e amizade. Que o Senhor Jesus o proteja sempre!

Aos meus professores da pós-graduação por todo ensinamento.

A UESC e ao programa de pós-graduação em Química pela oportunidade concedida e por todo apoio acadêmico.

A FAPESB pela concessão de bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora pelo aceite do convite.

SILVA, T.P. Produção, pré-purificação, caracterização e aplicação de lipase produzida por *Penicillium roqueforti* durante a fermentação em estado sólido do farelo de cacau. Ilhéus-BA: UESC, 2016. 77p. (Dissertação: Mestrado em Química – Área de Concentração em Produtos Naturais).

RESUMO

As lipases (EC 3.1.1.3, triacilglicerol lipase) são as enzimas que catalisam a hidrólise de gorduras e óleos, e liberam ácidos graxos livres, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol. Ainda são capazes de efetivar reações reversas de síntese, como reações como esterificação, transesterificação, interesterificação. Diante dessa ampla eficiência catalítica a lipase é considerada uma das enzimas com maior potencial biotecnológico. Esta enzima pode ser obtida por fermentação em estado sólido (FES), no qual são utilizados substratos insolúveis (resíduos da agroindústria) com baixos teores de atividade de água em sua composição. Os mesmos atuam como fonte de nutrientes para o metabolismo dos microrganismos empregados. O objetivo desse trabalho foi caracterizar o farelo de cacau, para utilizá-lo como substrato na produção de lipase através fermentação em estado sólido por *Penicillium roqueforti*. Para a otimização do processo utilizou-se o delineamento composto central rotacional, onde foram avaliados a significância das variáveis, atividade de água (a_w) e temperatura. A melhor atividade lipásica encontrada foi 17,93 U/g, em 60 horas de fermentação, 0,864 a_w e temperatura de 27,81°C. O modelo matemático indicou um ponto crítico de atividade enzimática 16,43 U/g que foi validado com uma repetição em média de triplicata 17,93 U/g. Ainda foi realizado várias caracterizações do extrato enzimático bruto, pH e temperatura ótimos; termoestabilidade; estabilidade ao congelamento da biomassa e do extrato multienzimático; a lipase em estudo conseguiu hidrolisar diferentes óleos, oliva, soja, dendê, óleos de fritura soja e dendê, além do *p*-nitrofenilpalmitato; *ainda* foi observado os parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$ aparente) da lipase para todos os substratos; verificou-se também a influência de íons e solventes na atividade lipásica. Foi feito o estudo de purificação por sulfato de amônio e a dosagem de proteínas totais pelo método de Lowry. A lipase produzida foi aplicada na reação de esterificação do ácido oleico, demonstrando bastante eficiência no processo.

Palavras-chave: Fermentação em Estado Sólido, Farelo de cacau, Lipase, Caracterização, Aplicação.

SILVA, T. P. Production, pre-purification, characterization and application of lipase produced by *Penicillium roqueforti* during solid state fermentation of cocoa meal. Ilheus-BA: UESC, 2016. 77p. (Dissertation: MSc in Chemistry - Area of Concentration in Natural Products).

ABSTRACT

Lipases (EC 3.1.1.3, triacylglycerol lipase) are enzymes that catalyze the hydrolysis of fats and oils, and release free fatty acids, diglycerides, monoglycerides and glycerol. Yet they are capable of effecting reversal reactions synthesis reactions such as esterification, transesterification, interesterification. Given this broad catalytic efficiency lipase enzymes is considered one of the most potential biotech. This enzyme can be obtained by solid state fermentation (SSF), in which insoluble substrates are used (waste agro-industry) with low water activity levels in its composition. They act as a source of nutrients for the metabolism of the microorganisms employed. The aim of this study was to characterize the cocoa meal, to use it as a substrate for the production of lipase by solid state fermentation by *Penicillium roqueforti*. To optimize the process used the central composite design that evaluated the significance of the variables, water activity (aw) and temperature. The best lipase activity found was 17.93 U / g in 60 hours of fermentation, and 0.864 w 27.81 ° C. The mathematical model indicated a critical enzyme activity 16,43 U / g which was validated with a repeat on average of triplicate 17.93 U / g. Still it was performed several characterizations of crude enzyme extract, optimum pH and temperature; thermostability; stability to freezing of biomass and multienzyme extract; lipase under study could hydrolyze different oils, olive, soy, palm oil, soybean frying oil and palm, in addition to p-nitrophenyl palmitate; It was still observed kinetic parameters (Vmax and Km apparent) of the lipase for all substrates; also found it is the influence of ions and solvents on lipase activity. the study by purification by ammonium sulfate and the dosage of total proteins by Lowry's method was made. The lipase produced was applied to the oleic acid esterification reaction, showing very efficient process.

Keyword: SSF showed, cocoa bran, Lipase, Characterization, Application.

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1: Fruto do Cacau.....	14
Figura 2: Representação das etapas no beneficiamento do cacau	15
Figura 3: Panorama de produção de resíduos no Brasil	16
Figura 4: Fermentação em estado sólido.....	17
Figura 5: Fungo <i>Penicillium roqueforti</i>	20

Capítulo II

Figura 1: Farelo de cacau, triturado em moinho de facas	35
Figura 2: Farelo de cacau fermentado, com o fungo <i>Penicillium roqueforti</i> crescido. 35	
Figura 3: Perfil fermentativo	45
Figura 4: Diagrama de Pareto.....	47
Figura 5: Superfície de contorno e de resposta	48
Figura 6: Diagrama de Pareto.....	51
Figura 7: Superfície de contorno e de resposta	52
Figura 8: Termoestabilidade da lipase de <i>Penicillium roqueforti</i>	53
Figura 9: Estabilidade ao congelamento da biomassa fermentada.....	54
Figura 10: Estabilidade ao congelamento do extrato enzimático bruto	55
Figura 11: Atividade lipásica frente a diferentes substratos	57

Capítulo III

Figura 1: Diagrama de Pareto.....	72
Figura 2: Superfície de contorno e de resposta	73

Sumário

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS	13
1.1.1 Objetivo Geral	13
1.1.2 Objetivos Específicos	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Cacau - <i>Theobroma cacao</i> L.	14
2.2 Resíduo de cacau.....	15
2.3 Fermentação em estado sólido (FES).....	17
2.4.1 Lipase por fermentação em estado sólido	21
2.4.2 Aplicações da lipase	24
3 CONCLUSÃO	25
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO II	31
RESUMO	31
ABSTRACT	32
1 INTRODUÇÃO	33
1.1. Material e Métodos	33
1.1.1 Microrganismo	34
1.1.2 Preparo do Inóculo	34
1.1.3. Obtenção e caracterização físico-química do substrato.....	34
1.1.4. Fermentação em estado sólido.....	35
1.1.5. Obtenção do extrato enzimático bruto	36
1.1.6. Determinação da atividade lipolítica	36
1.1.7. Perfil fermentativo.....	38
1.1.8. Otimização para obtenção de lipase	38
1.1.9. Caracterização do extrato enzimático bruto.....	39
1.1.9.1. Determinação de pH e temperatura ótimos	40
1.1.9.2. Termoestabilidade	40
1.1.9.3. Estabilidade ao congelamento da biomassa fermentada	41
1.1.9.4. Estabilidade ao congelamento do extrato enzimático bruto.....	41
1.1.9.5. Atividade lipolítica frente a diferentes substratos	41
1.1.9.6. Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e V_{max}	41
1.1.9.7. Atividade enzimática frente a diferentes sais.....	42

1.1.9.8. Atividade enzimática frente a diferentes solventes.....	42
1.1.9.9. Purificação parcial.....	42
1.1.9.10. Proteína total.....	42
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
2.1 Caracterização físico-química do substrato	43
2.2 Perfil fermentativo.....	44
2.3. Otimização da obtenção de lipase	45
2.4 Caracterização do extrato enzimático bruto.....	49
2.4.1 Determinação do pH e temperatura ótimos	49
2.4.2. Termoestabilidade	53
2.4.3. Estabilidade ao congelamento da biomassa fermentada	54
2.4.4. Estabilidade ao congelamento do extrato enzimático bruto.....	55
2.4.5. Atividade lipásica frente de diferentes substratos	56
2.2.6. Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e V_{max}	57
2.2.7 Atividade enzimática frente a diferentes sais.....	58
2.2.8. Atividade enzimática frente a diferentes solventes.....	59
2.2.9. Purificação parcial.....	60
3 CONCLUSÃO.....	61
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
CAPÍTULO III	65
RESUMO.....	66
1 INTRODUÇÃO	68
2 MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1 Enzima	69
2.2 Substratos e solventes.....	69
2.3 Reação de esterificação	69
2.4 Análise de conversão	69
2.5 Otimização da reação de esterificação.....	70
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4 CONCLUSÃO.....	74
5 REFERÊNCIAS	74

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

As indústrias de alimentos, que em sua grande maioria são agroindústrias, dentre outras áreas do mesmo âmbito, estão gerando uma enorme quantidade de rejeitos e resíduos. Considerando esse agravante, tem-se pensado nos diversos problemas que estão associados ao emprego destes resíduos, uma vez que estes são considerados potenciais poluentes, que degradam o meio ambiente (TOGASHI *et al.*, 2007). Existem muitos estudos a fim de agregar valor a estes, de modo que são reaproveitados para sintetizar produtos com diversas utilidades (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Tendo em vista a redução do acúmulo destes rejeitos, processos biotecnológicos vêm sendo estudados na atualidade, a produção de enzimas com aplicação industrial, aproveita os rejeitos como fonte de matéria prima, na obtenção dessas biomoléculas. A fermentação em estado sólido (FES) surge como uma estratégia viável para reciclar os resíduos gerados pela agroindústria. A mesma tem sido definida como o processo de fermentação que envolve uma matriz sólida, que deve ser realizado em ausência ou quase ausência de água; porém o substrato deve possuir teores de umidade e atividade de água suficiente para o crescimento, desenvolvimento e metabolismo do microrganismo empregado (SINGHANIA, R *et al.*, 2009). O baixo teor de umidade determina quais microrganismos podem ser empregados, tais como fungos, leveduras e algumas bactérias, destacando os fungos filamentosos, uma vez que o meio é semelhante ao habitat natural (COUTO, S.R.& SANDROMÁN, M.A. 2006). A escolha do fungo filamentoso *Penicillium roqueforti*, para utilização nesse trabalho, foi em virtude do mesmo ter classificação GRAS (Generally Recognized as Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration, USA), logo é um microrganismo seguro que pode ser utilizado em diferentes aplicações sobre tudo na área de alimentos.

Dentre as diversas enzimas que podem ser produzidas por esse processo fermentativo, a lipase (EC 3.1.1.3, triacilglicerol lipase) se destaca, por apresentar o maior número de aplicações industriais, já documentadas na literatura. É uma enzima que catalisa a hidrólise de gorduras e óleos, e liberam ácidos graxos livres, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol. Ainda são capazes de efetivar reações reversas de síntese, como reações como esterificação, transesterificação,

interesterificação (KAPOOR, M.& GUPTA, M.N. 2012). Por estas razões vem sendo intensificado o estudo para obtenção de lipases, pois as mesmas possuem diversas aplicações industriais, além de ser possível sua produção por FES que consegue aproveitar rejeitos da agroindústria, nesse caso o farelo de cacau, que é um resíduo abundante na região Sul da Bahia, por ser um subproduto da indústria de chocolates.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo, otimizar e produzir por fermentação sólida em farelo de cacau lipases do fungo *Penicillium roqueforti* e caracterizar bioquimicamente o extrato enzimático obtido visando sua aplicação industrial.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o farelo de cacau quanto às características físico-químicas.
- Otimizar a produção da lipase por fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *Penicillium roqueforti*.
- Caracterizar bioquimicamente o extrato enzimático bruto obtido.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cacau - *Theobroma cacao* L.

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma árvore típica de clima tropical, nativa da região de floresta úmida da América e constitui o principal fornecedor de matéria-prima para a fabricação do chocolate (CORRÊA, F.L.O. *et al.*,2006). O cacau é um fruto de valor cultural para o Brasil, mais especificamente para a região sul da Bahia. No entanto essa cultura sofreu um declínio muito grande no final do século XX, o que fez com que se buscassem alternativas para sua recuperação (GONZALES, 2013). O Brasil é o quinto produtor mundial de cacau, já tendo sido por muitos anos o primeiro. É também o único país que possui toda a cadeia produtiva do cacau (HOLANDA, 2012).

O fruto do cacau é caracterizado por ser de formato oval, de aproximadamente 20 a 30 cm de comprimento, além de possuir uma casca maciça que protege as amêndoas, quando maduros apresentam coloração vermelha ou amarela. A árvore é definida como cacaueiro, mede de 1,50 a 2,0 m de altura (figura 1). As amêndoas (sementes) são cobertas por uma polpa branca e utilizadas na obtenção do seu principal produto, o chocolate, através de um processo artesanal de fermentação das sementes e posterior torrefação (conforme esquema apresentado na figura 2) (GONZALES *et al.*, 2013). Durante esse beneficiamento do cacau, são gerados, diferentes resíduos, as cascas do cacau, que podem ser utilizados para produção de adubo orgânico, e na etapa de secagem e torrefação, é gerado o farelo de cacau, que é o rejeito de interesse desse estudo devido a presença de lipídios em sua composição, que agrega valor na obtenção da lipase.



Figura 1: Fruto do Cacau (Fonte: Imagem do google)

Inicialmente na lavoura do cacau (*Theobroma cacao* L.) agregava-se valor apenas às suas amêndoas que são utilizadas na fabricação de manteiga e chocolate, no entanto com o passar do tempo observou-se a praticidade e facilidade na obtenção da polpa, bem como o seu valioso potencial econômico extra para os cacauicultores. A atividade cacauieira está associada, de maneira geral, às etapas de produção do cacau, desde a preparação da terra, implantação da cultura até a produção do cacau em amêndoas secas; comercialização, relacionada com a compra e venda de amêndoas secas e transporte até as indústrias de transformação; processamento e beneficiamento nas indústrias de transformação do cacau; comercialização dos subprodutos das amêndoas (GOMES et al, 2010).

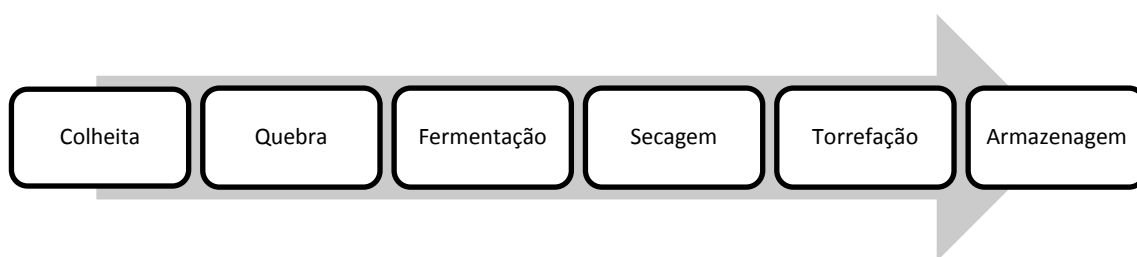


Figura 2: Representação das etapas no beneficiamento do cacau

2.2 Resíduo de cacau

No Brasil são encontrados diferentes tipos de resíduos agrícolas. No cenário brasileiro, a Bahia se destaca pela geração de resíduos do cacau, uma vez que a produção cacauieira constitui uma atividade econômica importante do estado. A casca do cacau é aproveitada nas práticas de adubação do cacauieiro. O farelo de cacau é um subproduto gerado no processo de torrefação da amêndoa, na indústria de chocolates, sendo utilizado, na alimentação animal, após passado por processos de purificação devido a presença da teobromina que é uma substância tóxica (PIRES et al., 2004).

O Brasil se destaca no setor agroindustrial devido a grande produção e exportação de suco de frutas, e em consequência gera diversos subprodutos na forma de rejeitos. A (figura 3) mostra o panorama de produção de resíduos agroindustriais no Brasil. Observando a figura 3, vê-se que o Brasil é um grande produtor de rejeitos, dentre estes, o cacau (*Theobroma cacao* L.) na região nordeste, mais específico na Bahia, apresenta dois principais coprodutos, sendo a casca do fruto e o farelo de cacau.



Figura 3: Panorama de produção de resíduos no Brasil (Fonte: Imagem do google)

Vale salientar a importância de estudos que visem o aproveitamento dos resíduos, pois uma tonelada de cacau seco produz oito toneladas de casca fresca que são na maioria das vezes descartadas (CEPLAC, 2012). Partindo dessas premissas alguns grupos de pesquisa têm investido seus esforços no sentido do aproveitamento integral do fruto do cacau e seus rejeitos para uso na produção de bioprodutos de interesse comercial e industrial, tais como biofertilizantes eco-compatíveis, obtenção de biomoléculas (enzimas) ou ainda como matéria-prima para produção de biocombustíveis e de seus insumos (GONZALES, *et al* 2013). O farelo do cacau possui um grande potencial para a produção de biomoléculas, pois o mesmo possui características bromatológicas ideais para o crescimento de microrganismos (tabela 1).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do farelo de cacau (Fonte: SILVA *et.al* 2005)

Composição Bromatológica	% (g/100)
Proteína total	52,2%
Carbono Total	92,64%
Lípidios	11,09%
Nitrogênio Total	13,62%

2.3 Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como o processo de crescimento microbiano na superfície de materiais sólidos que apresentam a propriedade de absorver ou de conter água, com atividade de água (a_w) suficiente apenas para manter o crescimento e o metabolismo do micro-organismo (RAHARDJO et al., 2006). A fermentação em escala laboratorial pode ser realizada em erlenmeyers como apresentado da figura 4.



Figura 4: Fermentação em estado sólido do fungo *Pencicillium roqueforti* em resíduo de cacau tratado. Fonte: autora

A fermentação em estado sólido (FES) ao contrário da fermentação submersa (FS) apresenta grandes vantagens como o grande rendimento produtivo, pouca produção de resíduos e exige equipamentos simples de fermentação. Para um bom aproveitamento, devem-se levar em conta vários fatores, dentre os quais: a seleção criteriosa do micro-organismo e do substrato, além do controle dos parâmetros fermentativos (PANDEY, 2012). A partir da FES, são obtidos vários metabólitos primários e secundários de interesse industrial, como por exemplo, as enzimas utilizadas em diversos processos. Atualmente, o reaproveitamento de resíduos e/ou coprodutos da agroindústria, vem alcançando um lugar de destaque, certamente em função das questões ambientais. Considerando que o Brasil é um país com abundância em matérias-primas agroindustriais, torna-se interessante aproveitá-las em bioprocessos, a partir da FES (GARLAPATI & BANERJEE, 2010).

Os processos de fermentação no estado sólido têm um potencial econômico considerável na produção de produtos para as indústrias de alimentos para consumo humano e animal, farmacêutica e agrícola. Além disso, esses procedimentos são de interesse econômico especial para países com abundância de resíduos agroindustriais e biomassa, visto que podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo (MACIEL, 2006).

2.3.1 Variáveis que influenciam a FES

Para determinar as melhores condições de fermentação para a obtenção de enzimas faz-se necessário identificar as variáveis do processo. Desta maneira vê-se que estes parâmetros são de suma importância. Entre todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, tem destaque a atividade de água (a_w), que deve ser baixa, para evitar a contaminação do meio. Na FES, o micro-organismo possui um limite de água para suas atividades metabólicas e seu crescimento. Segundo Pelizer *et al.* (2003) a atividade de água influencia o crescimento microbiano e processos biológicos e enzimáticos. Cada microrganismo possui um limite mínimo de atividade de água para realizar suas atividades metabólicas. Portanto, a atividade de água (a_w) mínima para o crescimento de fungos é em torno de 0,70; para leveduras 0,80 e, para bactérias, 0,90 (JAY, J. M., 2005).

O tamanho das partículas (granulometria) do substrato, também é importante, para facilitar o crescimento dos microrganismos. Partículas pequenas favorecem a compactação do sólido em consequência, dificulta a circulação de gases no meio. Em conta partida, partículas grandes favorecem maior aeração, no entanto limitam a superfície de contato do substrato para o microrganismo (DEL BIANCHI *et al.*, 2011).

A temperatura é um parâmetro de suma importância no crescimento dos microrganismos envolvidos, estando relacionado com a transferência de calor que ocorre no processo (PANDEY, 2004), portanto pode-se inferir que as reações envolvidas no crescimento microbiano são exotérmicas. Todo microrganismo tem sua faixa de temperatura ideal, tais como os psicrófilos crescem em temperaturas de 10 a 15°C, mas há muitos microrganismos que se desenvolvem em temperaturas mais baixas. Fazem parte deste grupo bactérias, fungos, algas e protozoários. Esses agentes são encontrados em águas frias, em solos oceânicos e em regiões polares. A maioria dos

microrganismos marinhos são psicrofílicos, como as bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Polaromonas*. Os mesófilos crescem em temperatura ambiente de 25 a 40°C. Fazem parte deste grupo a maioria dos microrganismos patogênicos, pois esta faixa de temperatura está mais próxima da temperatura corpórea humana de 37°C. Destacam-se as bactérias saprófitas, fungos, algas e protozoários. Os microrganismos termófilos crescem em torno de 40 a 85°C. Esses agentes são encontrados em áreas vulcânicas, em mistura de fertilizantes e em nascentes quentes. Somente os microrganismos procarióticos crescem nestas temperaturas, como a bactéria *Bacillus stearothermophilus*. O grupo das arqueobactérias é capaz de desenvolver em temperaturas acima de 100°C, como a *Pyrodictium occultum*, *Pirococcus woesei* e *Termococcus celer* (Pelczar., 1996). O *Penicillium* é mesófilo cresce em temperatura ambiente de 25 a 40°C. O pH é um fator crítico na FES, por conta da heterogeneidade e consistência do material, sendo difícil de ser controlado. Diante a adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato tem se tornado importante (SCHMIDELL et al., 2001).

2.3.2 Microrganismos empregados na FES

Na Fermentação em Estado Sólido, os fungos filamentosos representam os micro-organismos mais promissores, pela variedade de produtos de seu metabolismo e devido ao desenvolvimento das hifas que permite aos mesmos maiores penetrações no substrato e nas regiões porosas entre partículas da matéria-prima. Além disso, a maioria dos fungos possui capacidade de crescer em meios com baixa atividade de água (a_w) e baixo pH, e produz enzimas extracelulares hidrolíticas para degradar as macromoléculas presentes no substrato sólido, favorecendo assim o seu uso em FES (RAHARDJO et al., 2006). De acordo Hasan, *et.al.*,(2002), dentre os fungos filamentosos, as três classes mais usadas em FES são Phycomycetes (*Mucor* e *Rhizopus*), Ascomycetes (*Aspergillus* e *Penicillium*) e Basidomycetes (*Polysporus*).

2.3.2.1 *Penicillium roqueforti*

O *Penicillium roqueforti* é um fungo filamentoso que pode ser isolado do solo, degradando substâncias orgânicas e partes vegetais. O *Penicillium* multiplica-se

vegetativamente por conídios produzidos em cadeia em conidióforos que se ramificam na extremidade, lembrando uma vassoura (figura 5.a). Estes conídios, após disseminados, produzirão novo micélio (Kimati et al., 1978). Esse micélio responsável pela nutrição do fungo é formado por hifas e possui coloração azul esverdeada, conforme apresentado na figura 5.b:

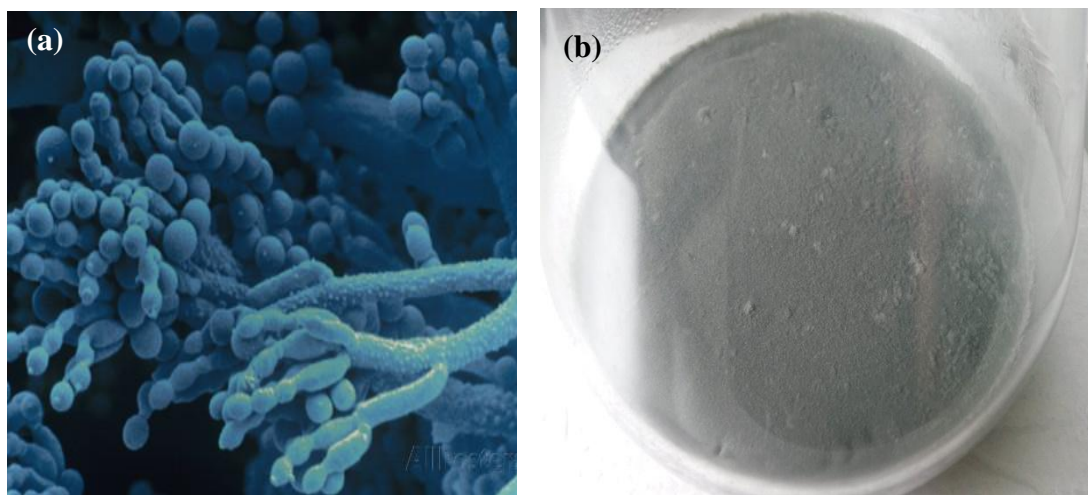


Figura 5: Fungo *Penicillium roqueforti*, parte “a” (morfologia microscópica) e parte “b”(morfologia macroscópica). Fonte: “a” CorbisImages-2015; “b”Autora.

Entre fungos filamentosos, o gênero *Penicillium* contém muitos produtores de lipase, pois é possível ocorrer a produção sem a necessidade de indutores (óleos e/ou gorduras), pois esse fungo é altamente adaptado a reações de hidrólise de triglicerídeos devido a sua grande utilização na produção de queijos, inclusive o queijo Roquefort que leva o nome do fungo.(FERRER et al., 2000). Outro aspecto relevante deste fungo é a segurança, ele tem a classificação GRAS (Generally Recognized as Safe) do FDA (Food and Drug Administration), tornando os processos que o utilizam viáveis e os produtos finais, (enzima e substrato fermentado) são perfeitamente possíveis de serem direcionado à alimentação, por exemplo.

2.4 Lipase (EC 3.1.1.3, triacilglicerol)

As lipases são enzimas que hidrolisam ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (acima de oito carbonos) produzindo monogliceróis e diacilgliceróis e ácidos graxos livres numa emulsão que forma uma interface óleo-água. As lipases também são usadas como catalizadores em reações de esterificação, transesterificação e interesterificação

(SANTOS, R.R. *et.al.*, 2014). Existem outras enzimas que catalisam ácidos graxos, são as estereases e cutinases a diferença entre elas e uma lipase está no fato de que a lipase catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterase age em substratos solúveis (ERICSSON *et al.*, 2008).

A lipase se destaca entre as enzimas devido a sua variedade de aplicações, e o uso dela em processos biotecnológicos, gerando produtos valiosos, tais como produtos farmacêuticos, agrotóxicos, biocombustíveis e em compostos de aroma (JOSEPH, B. & RAMTEKE, P.W., 2008; JAEGER, E.K. & EGGERT, T., 2002; SANTOS, R.R. *et.al.*, 2014). As lipases são produzidas por vários microrganismos, animais e plantas. Porém a maioria das lipases utilizadas em processos biotecnológicos é obtida a partir de fungos, leveduras e bactérias conforme (tabela 2). Existem as lipases extracelulares e intracelulares, porém as microbianas em geral são extracelulares, isso é são excretadas através da membrana externa para o meio de cultura (TAN *et al.*, 2003). Os fungos filamentosos são os principais produtores de lipase, pois eles produzem a maioria das enzimas em ambientes extracelulares. Destacam-se os microrganismos dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* e *Geotrichum* (ÜLKER, S. & KARAOGLU, A.S. 2012).

2.4.1 Lipase por fermentação em estado sólido

O uso de lipase como biocatalisador com aplicação industrial vem crescendo muito na atualidade e isso se dá devido às grandes vantagens que ela possui em catalisar reações sob condições mínimas de temperatura e pressão, o que reduz os gastos energéticos, um dos principais enfoques da indústria (POLIZELLI, 2005). Estas enzimas podem ser obtidas por fermentação em estado sólido (FES), no qual são utilizados substratos insolúveis (resíduos da agroindústria) com baixos teores de atividade de água em sua composição. Os mesmos atuam como fonte de nutrientes para o metabolismo dos microrganismos empregados (PANDEY, 2003).

A produção de lipase via FES tem sido relatada principalmente por fungos filamentosos e pouco por bactérias e leveduras; utilizando resíduos da agroindústria. Muitos estudos vêm sendo realizados para obtenção de lipases para aplicações industriais com diferentes substratos e fungos, como demonstra a tabela 2.

Observa-se que a maioria dos estudos de produção de lipase relatados na literatura, são realizados suplementação do meio fermentativo, principalmente com óleos, com ureia, ou com mix de resíduos agroindustriais, o que justifica muitas vezes os valores de atividade enzimática elevados. Nesse estudo em questão, foi utilizado somente como indutor o fungo filamentosso *Penicillium roqueforti*, farelo de cacau e água.

Tabela 2: Estudos realizados para obtenção de lipase por fermentação em estado sólido por diferentes fungos e diferentes substratos.

Microrganismos	Resíduos agroindustriais	Tempo de fermentação (horas)	Atividade lipásica	Produtividade (U/g.h)	Referências
<i>A. niger</i> mutante	Farelo de trigo e borra de milho	48	62,7U/g	1,3	Damaso et al. 2008
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	96	33.03	0,34	Contesini et al.2009
<i>A. niger</i>	Bolo de óleo de coco, farelo de trigo	96	628,7 U/gms	6,5	Edwinoliver et al.2010
<i>A.niger</i>	Farelo de cacau	48	11,67 U/g	0,24 U/g.h	Amorim et al. (2012)
<i>Asp ergillus sp</i>	Farelo de soja	96	25,07 U	0,26	Colla et al. (2010)
<i>A. fumigatus</i>	Óleo de soja	120	119,46 U/gms	0,99	Martins et al. 2008
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Bagaço de cana e farelo de trigo	168	9,3	0,05	Babu e Rao (2007)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Farelo de trigo, enriquecido com 5% de óleo de milho	72	U/gms	1,5	Fernandes et al. (2007)
<i>P. simplicissimum</i>	Torta de soja	100	21	0,21	Di Luccio et al.
<i>Penicillium Simplicissimum</i>	Torta de mamona	96	155.8 U/g	1,62	Godoy et al. (2011)
<i>Penicillium sp.</i>	Farelo de soja	48	186 U/g	3,87	Vardanega et al.
<i>Penicillium Brevicompectum</i>	Torta de babaçu	96	98.78 U/g	1,02	Silva et al. (2011)
<i>Penicillium sp.</i>	Farelo de soja	48	19,2 U/g	0,4	Griebeler et al. (2011)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Farelo de soja	120	96.52 U/g	0,8	Garlapati Banerjee (2010)

2.4.2 Aplicações da lipase

A lipase se destaca entre as demais enzimas, devido a sua grande aplicação biotecnológica, sendo esta utilizada em diversas indústrias.

✓ Indústria de alimentos

São utilizadas principalmente na hidrólise de óleos e gorduras presentes em alguns alimentos. No setor de laticínios são utilizadas em queijos na alteração e intensificação do sabor e em processos de aceleração da maturação, além de serem empregadas para obtenção de margarinas de baixo teor calórico, entre outras (Alonso, 2001).

As lipases podem também ser utilizadas na hidrólise da gordura do leite, na obtenção de melhor textura de massas de pães, na maturação de salsichas ou ainda na remoção de gordura de produtos de carnes e peixe (Godoy, 2009).

✓ Indústria de detergentes

O emprego de lipases nesse setor é responsável pela venda de cerca de 1.000 toneladas de lipases por ano. Devido a habilidade em hidrolisar gorduras, as lipases são utilizadas para facilitar o rompimento de ligações presentes nos triacilgliceróis e, conseqüentemente solubilizar gorduras aderidas ao tecido (SHARMA, CHRISTI E BANERJEE, 2001).

✓ Biodiesel

A lipase se destaca como um potencial catalisador utilizado na obtenção de pois as mesmas conseguem atuar sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol. São um grupo de grande importância por sua habilidade única de hidrolisar as ligações éster de ácidos graxos de cadeia longa em ambientes aquosos e sintetizá-las em meio não aquoso. O biocombustível em questão pode ser produzido por alcoólise ou hidrólise seguida de esterificação utilizando lipases. Um número considerável de lipases bacterianas e fúngicas tem sido produzido comercialmente, sendo a última mais prática porque fungos produzem enzimas extracelulares, que são mais fáceis de recuperar a partir do caldo de fermentação (DHEEMAN et al., 2011).

3 CONCLUSÃO

A utilização da lipase na indústria vem crescendo significativamente, mesmo em meio aos obstáculos, que estão intimamente ligados aos custos na produção, bem como na possível reutilização desse catalizador biológico. No entanto o processo de fermentação em estado sólido vem abrindo novas oportunidades, pelo fato de utilizar uma matriz decorrente de rejeitos agroindustriais, que em consequência barateia os custos de produção que são explicitados nos variados estudos citados nesse trabalho.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, F.O.M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. Rio de Janeiro: Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

AMORIM, G. M.; SANTOS, T. C.; PACHECO, C. S. V.; BARRETO, I. M. A.; FREIRE, D. M. G.; FRANCO, M. Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, 8(1):24-27, janeiro-junho 2012.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of Analysis. 18 ed. Washington DC USA, 2006.

BABU, I. S.; RAO, G. H. Lipase production by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 in solid state fermentation using mixed substrate. **Journal of Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 469-474, 2007.

BINOD, P.; PALKHIWALA, P.; GAIKAIWARI, R.; NAMPOOTHIRI, KM.; DUGGAL, A.; DEY, K.; PANDEY, A.. (2013). Industrial enzymes-present status and future perspectives for India. **Journal of Scientific & Industrial Research**, 72(5): 271-286.

CEPLAC- Comissão Executiva do plano da lavoura cacauera. Disponível em: www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm Acesso em: 5 de junho 2016.

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

CONTESINI, F. J.; SILVA, V. C. F.; MACIEL, R. F.; LIMA, R. J.; BARROS, F. F. C.; CARVALHO, P. D. Response surface analysis for the production of an enantio selective lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation. **Journal of Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 563–571, 2009.

CORRÊA, F.L.O.C.; SOUZA, C.A.S.; CARVALHO, J.G.; MENDONÇA, V.; VICHATO, M. Fósforo e zinco no desenvolvimento de mudas de cacauero. **Agrotropica**, v.18, n.1, p.15-24. 2006.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A Review. **Journal of Food Engineering**, Califórnia, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

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

- DEL BIANCHI, V. L., MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F. **Biotechnologia industrial: Fermentação em Estado Sólido**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, vol. 2. 2001.
- DHEEMAN, S. D.; BABUB, A. S.; FRIAS, J. M.; HENEHANA, G. T. M. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 256– 262, 2011.
- DI LUCCIO, M.; CAPRA, F.; RIBEIRO, N. P.; VARGAS, G. D. L. P.; FREIRE, D. M. G.; DE OLIVEIRA, D. Effect of temperature, moisture and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 113, p. 173-180, 2004.
- EDWINOLIVER, N. G.; THIRUNAVUKARASU, K.; NAIDU, R. B.; GOWTHAMAN, M. K.; KAMBE, T. N.; KAMINI, N. R. Scale up of a novel tri-substrate fermentation for enhanced production of *Asp ergillus niger* lipase for tallow hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6791-6796, 2010.
- ERICSSON DJ, KASRAYAN A, JOHANSSON P, BERGFORS T, SANDSTROM AG, BACKVALL JE. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **J Mol Biol** 2008;376(1):109–19.
- FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, p. 8-13, 2007.
- FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A., Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.75, p.569-576, 2000.
- GARLAPATI VK, Vundavilli PR and Banerjee R. Evaluation of lipase production by Genetic algorithm and Particle swarm optimization and their comparative study. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 162: 1350-1361, 2010.
- GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; CASTRO, A. M.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, D. M. G.; Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 945–53, 2011.

GOMES, Andréia da Silva; PIRES, Mônica de Moura; FREIRE, Carla Regina Ferreira. **A crise da atividade cacauera e a agroindústria do cacau no Estado da Bahia, Brasil**. Asociación Latinoamericana de Sociología.2010.

GONZALES, A. D. F. Desenvolvimento sustentável para o resgate da cultura do cacau baseado no aproveitamento de resíduos. **Interfaces Científicas -Saúde e Ambiente** .Aracaju . V.1 . N.2 . p. 41-52 .fev. 2013.

GRIEBELER, N.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; CECHET, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; RIGO, E.; NINOW, J. L. Isolation and Screening of Lipase-Producing Fungi with Hydrolytic Activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 4, p. 578-586, 2011.

HASAN, F., SHAH, A.A. and HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enz. Microb. Technol.*, 39:235–51, 2006.

HOLANDA, M. Chocolate para o mundo ver. Jul/2012. Agência Prodetec.

Disponível em: www.agenciaprodetec.com.br/especiais/275-cacau-apos-crise-transformacao-e-mercadoem-alta-.html

Acesso em: 5 de junho 2016.

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

JAY, J. M. Microbiologia de Alimentos. 6ª edição, Rio Grande do Sul: Artmed, 2005.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. **Biotechnol. Adv.** 2008, 26, 457

KAPOOR M., GUPTA, M.N. (2012) Lipase Promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry** 47, 555- 569.

KIMATI, H. Fungos. In: GALLI, F., TOKESHI, H., CARVALHO, P.C.T.,BALMER, T.L., CARDOSO, C.O.N., SALGADO, C.L., KUGNER, T.L., CARDOSO, E.J.V.B., BERGAMIM FILHO, A.. **Manual de Fitopatologia**. Editora Agronômica Ceres, 2 ed. São Paulo,SP, 1978.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, UFP, Curitiba, 146p., 2006.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1942-1947, 2008.

OLIVEIRA, L.F.; NASCIMENTO, M.R.F.; BORGES, S.V. et al. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* deg.) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.3, p.259-262, 2002.

PANDEY A. Solid-state fermentation. **Biochem Eng J** 13: 81-84, 2003.

PANDEY, A. **Concise Encyclopedia of Bioresource Technology**. New York: The Haworth Press, 735 p, 2004.

PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.3636, p.14, 2012.

PELIZER, L. H. et al. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 371-375, 2003.

PIRES, A.J.V., CARVALHO JR., J.N.; SILVA, F.F.; VELOSO. C.M.; SOUZA, A.L.; OLIVEIRA, T.N.; SANTOS, C.L.; CARVALHO, G.G.P. BERNARDINO, F.S. Farelo de Cacau na Alimentação de Ovinos. **Revista Ceres**, v.51, n.293, p.33-43, 2004.

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

SANTOS, R. R.; MURUCI, L.N.M.; SANTOS, L.O.; ANTONIASSI, R.; SILVA, J. P. L.; DAMASO, M.C.T. Characterization of Different Oil Soapstocks and Their Application in the Lipase Production by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation. **Journal of Food and Nutrition Research**. Vol. 2, No. 9, p.561-566, 2014.

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E. AND BORZANI, W., **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Blucher, São Paulo (2001).

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SILVA, H. G. O.; PIRES, A. J. V.; SILVA, F. F.; VELOSO, C. M.; CARVALHO, G. G. P.; CEZÁRIO, A. S., SANTOS, C. C.; Farelo de Cacau (*Theobroma cacao* L.) e Torta de Dendê (*Elaeis guineensis*, Jaca) na Alimentação de Cabras em Lactação: Consumo e Produção de Leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.5, p.1786-1794, 2005.

SILVA, M. F.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V. Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of

babassu cake and castor meal. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 2, p. 145–152, 2011.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K., SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

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

TOGASHI, C.K.; FONSECA, J.B.; SOARES, R.T.R.N.; GASPAR, A.; DETMANN, E.; OLIVEIRA, R.A. (2007). Composição em ácidos graxos dos tecidos de frangos de corte alimentados com subprodutos de maracujá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n.6, p. 2063-2068. ISSN impresso 1516-3598, ISSN on-line 1806-9290.

ULKER, S.; KARAOĞLU SA. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. corticola* isolated from soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. VOL. 114 No. 4, 385e390, 2012.

VARDANEGA, R.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; POLLONI, A.; RIGO, E.; NINOW, J. L. A systematic study on extraction of lipase obtained by solid-state fermentation of soybean meal by a newly isolated strain of *Penicillium sp.* **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 461–465, 2010.

CAPÍTULO II

SILVA, T.P. Emprego do farelo de cacau para a obtenção e caracterização de um extrato enzimático contendo atividade de lipase de *Penicillium roqueforti*. Ilhéus-BA: UESC, 2016. 77p. (Dissertação: Mestrado em Química – Área de Concentração em Produtos Naturais).

RESUMO

Lipases são enzimas de grande interesse e aplicação industriais, por este motivo, foi investigada a produção de um extrato enzimático, contendo atividade de lipase (*Lip*, U/g), de *Penicillium roqueforti* cultivado apenas em farelo de cacau. A otimização das condições de cultivo ($a_w = 0.888$ / $T = 26.75^\circ\text{C}$ / $t = 60$ h) resultou em uma produtividade de $0.289 \pm x$ U/g.h. O extrato enzimático apresentou condições ótimas de pH e T para *Lip* de, 6.8 e 33.8°C , respectivamente; a estabilidade térmica foi melhor a 50°C , com uma meia-vida estimada em 50 min e a adição dos solventes diclorometano ou éter metílico ou dos sais CoCl_2 , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ou MgCl_2 ao tampão de incubação favoreceu a *Lip*. A enzima foi capaz de hidrolisar diferentes substratos, azeite de oliva (18 U/g), óleos de soja e dendê (15 e 16,5 U/g), óleos de fritura soja e dendê (6,5 e 8 U/g), além do *p*-nitrofenil-palmitato (48,64 U/g); ainda foi observado as tendências com os parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$ aparente) da lipase para todos os substratos azeite de oliva (7,58g/mL e 17,6), óleos de soja e dendê (3,44 g/mL e 15,77; 8,45 g/mL e 19,34), óleos de fritura soja e dendê (4,46 g/mL e 20,32; 9,56g/mL e 16,9) , além do *p*-nitrofenil-palmitato (0,788 g/mL e 37,17). Foi feito o estudo de purificação por sulfato de amônio e a dosagem de proteínas totais pelo método de Lowry. O farelo de cacau, portanto, pode ser empregado de forma viável para a produção de extratos enzimáticos contendo, por exemplo lipases semelhante às descritas na literatura.

Palavras-chave: *Penicillium roqueforti*, fermentação em estado sólido, lipase.

SILVA, T. P. Employment cocoa meal for obtaining and characterization of an enzyme extract containing lipase activity of *Penicillium roqueforti*. Ilheus-BA: UESC, 2016. 77p. (Dissertation: MSc in Chemistry - Area of Concentration in Natural Products).

ABSTRACT

Lipases are enzymes of high interest and industrial application for this reason, the production of a enzyme extract was investigated, containing lipase activity (Lip U / g) of *Penicillium roqueforti* cultivated only in cocoa meal. The optimization of culture conditions ($a_w = 0.888$ / $T = 26.75$ ° C / $t = 60$ h) resulted in a yield of $0.289 \times U / G.H$. The enzyme extract showed optimal conditions of pH and T for Lip, 6.8 and 33.8 ° C respectively; thermal stability was better at 50 ° C, with an estimated half-life of 50 min and the addition of the methyl ether, or dichloromethane solvents or $CoCl_2$ salts, $Pb(C_2H_3O_2)_2$ or $MgCl_2$ to the incubation buffer favored Lip. The enzyme was able to hydrolyze different substrates, olive oil (18 U / g), soybean oil and palm oil (15 and 16.5 U / g), soybean frying oil and palm oil (6.5 and 8 U / g), and p-nitrophenyl palmitate (48.64 U / g); It was still observed trends with kinetic parameters (V_{max} and K_m apparent) of the lipase for all substrates olive oil (7,58g / mL and 17.6), soybean oil and palm oil (3.44g / ml and 15.77; 8.45 g / ml and 19.34), soybean frying oil and palm oil (4,46 g/mL e 20,32; 9,56g/mL e 16,9), and p-nitrophenyl palmitate (0,788 g/mL e 37,17) the study by purification by ammonium sulfate and the dosage of total proteins by Lowry's method was made. The cocoa meal, therefore, may be used viably for the production of enzyme-containing extracts, e.g. lipases similar to those described in the literature.

Keywords: *Penicillium roqueforti*, solid state fermentation, lipase.

1 INTRODUÇÃO

Devido aos avanços na bioquímica de produção e nos processos de fermentação, tem crescido a produção de diferentes enzimas. Além disso, a utilização desses catalizadores biológicos vem se expandindo em diversas indústrias (SHARMA et al., 2001). A lipase tem um amplo campo de aplicações, na formulação de detergente, síntese de biosurfactantes, a indústria oleoquímica, a indústria de laticínios, o agroindústria química, fabricação de papel, nutrição, cosméticos e de transformação farmacêutica. O desenvolvimento de tecnologias baseadas na lipase para a síntese de novos compostos é rapidamente expandindo as utilizações destas enzimas (LIESE *et al.*, 2000).

Mesmo a lipase sendo uma enzima eficaz nos processos biotecnológicos, a utilização da mesma em escala industrial ainda é limitada devido aos onerosos custos de produção. A bioconversão de resíduos para a produção de lipases, bem como outras enzimas, ocupa posição de destaque, devido à possibilidade de obtenção de biocatalisadores com menor custo usando técnicas ambientalmente sustentáveis, tais como a fermentação em estado sólido (SALIHU, *et al.*, 2012; FLEURI, L.F., *et al.*, 2014).

Dentre os resíduos utilizados na fermentação em estado sólido para obtenção de lipase, apresentam-se os rejeitos da fruticultura, agricultura, indústrias de alimentos. Nesse estudo buscou-se a viabilização em utilizar o farelo de cacau, proveniente de indústrias de chocolate, como substrato, e como agente da fermentação sólida o fungo filamentosso *Penicillium roqueforti* para a produção de lipase. Além de caracterizar bioquimicamente o extrato enzimático bruto. Para a otimização dos processos foi utilizado o delineamento composto central rotacional, para estimar a significância das variáveis independentes atividade de água (a_w) e temperatura.

1.1. Material e Métodos

Os experimentos foram desenvolvidos e realizados no Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica (LaBioCat), da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), localizada em Ilhéus – Bahia.

1.1.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado nesse estudo foi o fungo filamentosso *Penicillium roqueforti* que foi cedido pela Fundação Oswaldo Cruz - RJ (FIOCRUZ-RJ), sendo esta cepa isolada, caracterizada e depositada no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, sob o registro de número: 40075 e lote: 079840075. Este fungo vem sendo periodicamente preservado em sílica e glicerol e mantido em ultrafreezer à temperatura -80°C.

1.1.2 Preparo do Inóculo

Para o preparo da suspensão de esporos, o fungo foi repicado em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (VETEC) e Ágar-Ágar (VETEC) em erlenmeyers de 250 mL, em um período de 7 dias em estufa bacteriológica (B.O.D.) a 26,5°C. A coleta dos esporos foi feita adicionando-se água destilada contendo Tween 80 (VETEC) (0,01%) e pérolas de vidro estéreis aos erlenmeyers. Para a contagem do número de esporos em suspensão utilizou-se câmara de Neubauer duplamente espelhada e microscópio binocular (BIOVAL L1000). A concentração de esporos utilizada foi de 10^7 esporos/g de farelo de cacau seco.

1.1.3. Obtenção e caracterização físico-química do substrato

O substrato utilizado em todos os experimentos foi o farelo de cacau cedido por indústrias de chocolate localizadas na região sul da Bahia. Sendo este previamente seco em estufa à 50°C por 24 horas e triturado em moinho de facas tipo Willey (ACB LABOR) a uma granulometria de 2 mm (Figura 1) sendo armazenado em embalagem plástica em local seco até o momento de uso.

A análise físico-química, quanto aos valores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE), foram realizadas segundo a metodologia da Association of Official Analytical Chemists - AOAC (2006). Os valores obtidos foram expressos em (g/100g de matéria seca).



Figura 1: Farelo de cacau, triturado em moinho de facas tipo Willey (ACB LABOR) a uma granulometria de 2 mm e farelo de cacau microscópico. Fonte: autora.

1.1.4. Fermentação em estado sólido

Para a fermentação (Figura 2) utilizou-se erlenmeyers de polipropileno 125 mL, contendo 10g do substrato, que em seguida foram autoclavados a 121°C e 1,0 atm de pressão por 15 minutos. Após o resfriamento, foi inoculado sobre o farelo de cacau a suspensão de esporos na concentração de 10^7 esporos/g de farelo e umedecido com água destilada estéril. As variações de quantidade de água foram determinadas pela variável atividade de água (a_w), sendo esta aferida em equipamento Novasinalabswift (TECNAL). As fermentações foram incubadas em estufas bacteriológicas (B.O.D.) sob diferentes temperaturas.

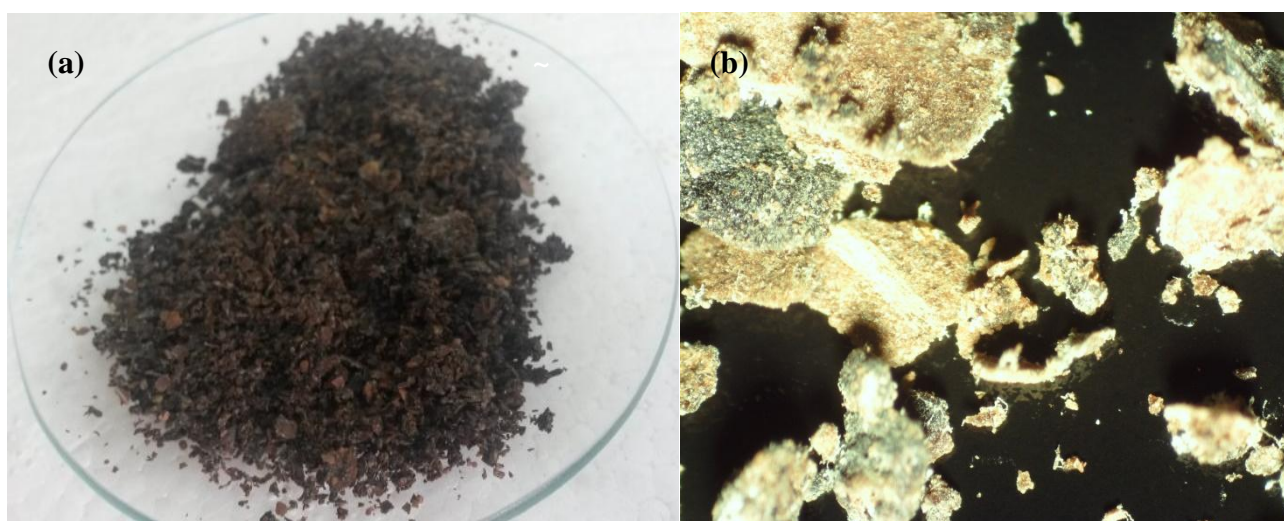


Figura 2: Farelo de cacau fermentado, com o fungo *Penicillium roqueforti* crescido(a), e imagem microscópica do resíduo com o fungo. Fonte: autora.

1.1.5. Obtenção do extrato enzimático bruto

A obtenção do extrato enzimático bruto ocorreu após o tempo de fermentação, onde são adicionados 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 ao substrato fermentado e após é colocado sob agitação em incubadora Shaker (TECNAL) a 35°C e 200 rpm por 20 minutos. O extrato bruto foi obtido por prensagem mecânica, com o auxílio de gaze e em seguida centrifugado a 704.34 g por 5 minutos para remoção de sólidos mais finos. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem da atividade lipolítica.

1.1.6. Determinação da atividade lipolítica

a) Titulação

A atividade lipolítica foi determinada pelo método titulométrico descrito por Gutarra et al., (2009) e Amorim et al., (2012). Foi preparada uma emulsão constituída por azeite de oliva (5% m/v) emulsionado por cinco minutos com goma arábica (10% p/v) em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0. Em cada erlenmeyer de 125 mL foi adicionado 10 mL da emulsão e 1 mL da amostra. Em seguida foram incubados sob agitação 200 rpm e 35°C, em incubadora Shaker (TECNAL) por 20 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma solução de acetona/etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos extraídos foram, titulados com uma solução de NaOH (0,04 M) até pH 11.

As amostras e brancos foram preparados em triplicata, sendo que nos brancos 1 mL do extrato enzimático foi adicionado somente no momento da titulação. Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de ácidos graxos por minuto por grama de substrato. O valor da atividade enzimática foi calculada conforme a equação 1 descrita a seguir AMORIM et al., (2012):

$$A = \frac{\left[\left(\frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot V_c} \right) \cdot V_d \right]}{m \cdot \left(\frac{As}{Au} \right)}$$

Equação (1)

Onde:

A = atividade lipásica (U/g);

V_a = Volume da amostra titulada (ml);

V_b = Volume do branco titulado (ml);

V_c = Volume da amostra usada na reação (ml);

V_d = Volume do tampão usado para a extração (ml);

t = Tempo de reação (min);

M = Molaridade da solução de NaOH;

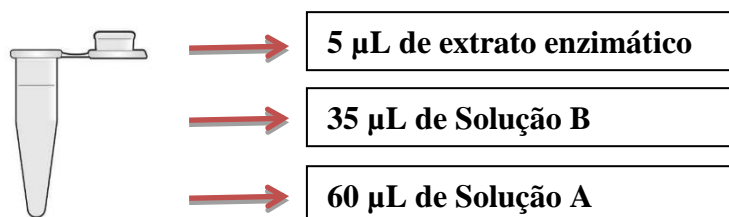
m = massa contida no erlenmeyer (g);

A_s = Massa da amostra seca (g);

A_u = Massa da amostra úmida (g).

b) Espectrofotométrica

Este método de quantificação se baseia na formação de um produto cromóforo (p-nitro fenol) a partir da reação de hidrólise de ésteres graxos do p-nitrofenil catalisada pelas lipases. A solução (A) foi preparada utilizando-se p-nitrofenil palmitato 15mmol/L em álcool isopropílico. A solução (B) foi preparada uma emulsão, contendo tampão Tris-HCl 66mM, pH 8,0 com Triton X-100 (0,6%) e Goma arábica (0,1%). A reação foi disparada pela adição do extrato enzimático, foi para o banho por 10 min 40°C, parou-se a reação com uma solução de ácido cítrico 1M. O progresso da reação (formação do p-nitrofenol) foi acompanhado em espectrofotômetro com leituras das absorvâncias a 410 nm. A atividade lipásica é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1,0 μmol de p- nitrofenil palmitato por minuto nas condições descritas anteriormente. A atividade lipásica espectrofotométrica foi expressa em U/ml. As reações foram realizadas em eppendorf seguindo a sequência apresentada no esquema 1. O cálculo da atividade enzimática foi feito pela Equação 2:



Esquema 1: Reação espectrofotométrica

$$\textit{Atividade Lipásica} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{(\alpha.F.V_f)}{V_a} . F_d \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

α = coeficiente angular da reta (Abs / tempo)

F = fator (concentração do produto / absorvância)

V_f = volume final (mL)

V_a = volume da amostra (mL)

F_d = fator de diluição

Calculou-se o fator, a partir de curva padrão, utilizando-se diferentes concentrações do p-nitrofenol. A atividade lipásica espectrofotométrica no meio fermentado sólido foi calculada conforme a equação 3 e expressa em U/g.

$$\textit{Atividade Lipásica} \left(\frac{U}{g} \right) = \frac{ALL \times V_{ext}}{M_i} \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

ALL = atividade lipásica espectrofotométrica no meio de extração líquido (U/mL)

V_{ext} = volume de extração enzimática (mL)

M_i = massa seca de torta inicial (g)

1.1.7. Perfil fermentativo

A cinética de fermentação foi analisada a fim de encontrar a maior atividade de hidrólise e o melhor tempo de fermentação. Para isso realizou-se a fermentação por 108 horas a 26,5°C e 0,854 a_w . A cada 12 horas uma fermentação foi retirada e determinada à atividade lipolítica (1.1.6). Cada tempo de fermentação foi realizado em triplicata.

1.1.8. Otimização para obtenção de lipase

Foi utilizado o delineamento composto central rotacional (2^3 DCCR), para otimizar a produção de lipase, pelo fungo *Penicillium roqueforti* através da fermentação sólida em farelo de cacau. As variáveis independentes nos níveis analisados foram

temperatura (T, °C) e atividade de água (a_w), totalizando assim 11 ensaios (com 4 pontos estrela ou axiais e 3 pontos centrais, conforme apresentado na Tabela 1). A partir da análise dos resultados foram submetidos à metodologia da superfície de resposta (MSR) que demonstra a relação entre as variáveis independentes estudadas, além de identificar a região de ótimo e o ponto crítico. O software utilizado para a análise dos dados foi o programa STATISTICA® 10 (StatSoft).

Tabela 1: Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR, 2^3) com seus níveis reais e codificados (em parênteses) para otimização da obtenção de lipase por *Penicillium roqueforti*, em 10g de farelo de cacau, 10^7 esporos/g, em estufa microbiológica (BOD), por 60 horas de fermentação.

Experimentos	Variáveis	
	a_w	Temperatura (°C)
1	0,864 (-1)	17,18 (-1)
2	0,913 (+1)	17,18 (-1)
3	0,864 (-1)	27,81 (+1)
4	0,912 (+1)	27,81 (+1)
5*	0,888 (0)	22,5 (0)
6*	0,888 (0)	22,5 (0)
7*	0,888 (0)	22,5 (0)
8	0,854 (-1,41)	22,5 (0)
9	0,923 (+1,41)	22,5 (0)
10	0,888 (0)	15 (-1,41)
11	0,888 (0)	30 (+1,41)

1.1.9. Caracterização do extrato enzimático bruto

Todas as caracterizações foram realizadas com extrato enzimático bruto, nas condições ótimas determinadas pela otimização descrita no item 2.2.6.

1.1.9.1. Determinação de pH e temperatura ótimos

Para a determinação de pH e temperatura ótimos foi utilizado o delineamento composto central rotacional (2^3 DCCR). Foram realizados 11 ensaios, sendo destes 3 pontos centrais e 4 pontos estrela ou axiais (Tabela 2). A atividade lipolítica foi analisada conforme descrito no item 2.2.5 alterando a temperatura e pH da reação. O software utilizado para análise dos resultados foi o programa STATISTICA® 10 (StatSoft).

Tabela 2: Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR, 2^3) com seus níveis reais e codificados (em parêntese) para a caracterização quanto ao pH e temperatura ótimos da lipase produzida por *Penicillium roqueforti*, em 10g de farelo de cacau, 10^7 esporos/g, em estufa microbiológica (BOD), 60 horas de fermentação com a_w 0,886 e temperatura 26,75°C, apontando uma atividade lipásica de 16,43 U/g.

Experimentos	Variáveis	
	pH	Temperatura (°C)
1	5,43 (-1)	24,36 (-1)
2	7,56 (+1)	24,36 (-1)
3	5,43 (-1)	45,63 (+1)
4	7,56 (+1)	45,63 (+1)
5*	6,5 (0)	35 (0)
6*	6,5 (0)	35 (0)
7*	6,5 (0)	35 (0)
8	5 (-1,41)	35 (0)
9	8 (+1,41)	35 (0)
10	6,5 (0)	20 (-1,41)
11	6,5 (0)	50 (+1,41)

1.1.9.2. Termoestabilidade

A estabilidade térmica da lipase foi determinada através da incubação do extrato bruto apontando uma atividade lipásica de 16,43 U/g, em temperaturas entre 35 e 80 °C, na ausência do substrato. Em intervalos de 10, 20, 30, 40 e 50 minutos, uma alíquota foi retirado e feito a dosagem da atividade residual da enzima.

1.1.9.3. Estabilidade ao congelamento da biomassa fermentada

A estabilidade da lipase ao congelamento da biomassa fermentada foi determinada através do congelamento desta à -4°C por 90 dias. A cada 10 dias foi retirado uma amostra congelada e feito a dosagem da atividade enzimática.

1.1.9.4. Estabilidade ao congelamento do extrato enzimático bruto

A estabilidade da lipase ao congelamento do extrato enzimático bruto apontando uma atividade lipásica de 16,43 U/g, foi determinada através do congelamento desta à -4°C por 90 dias. A cada 10 dias foi retirado uma amostra congelada e feito a dosagem da atividade enzimática.

1.1.9.5. Atividade lipolítica frente a diferentes substratos

Ensaio de atividade lipolítica frente a diferentes substratos foram realizados utilizando diferentes substrato: óleos de origem vegetal tais como, oliva, soja, dendê, óleo de soja de fritura e óleo de dendê de fritura (5% m/v) e o *p*-Nitrofenil-palmitato (15mmol/L).

1.1.9.6. Determinação dos parâmetros cinéticos K_M aparente e V_{max} aparente

A determinação dos parâmetros cinéticos, constante de Michaelis-Mentem (K_M) e a velocidade máxima (V_{max}), foram calculadas mediante distribuição dos dados no gráfico dos duplos recíprocos de velocidade de reação versus concentração do substrato, de acordo com o método de linearização de Lineweaver e Burk (1934). Foram realizadas variando-se a concentração do substrato padrão (azeite de oliva) na reação enzimática, além dos outros óleos vegetais, soja, dendê, óleo de soja de fritura e óleo de dendê de fritura e do substrato *p*-Nitrofenil-palmitato . A faixa escolhida para determinação foi de 10 a 50 g/L de óleo adicionado ao meio reacional. Para o substrato *p*-Nitrofenil-palmitato as concentrações foram, 1mg/mL, 31mg/mL, 41mg/mL, 51mg/mL, 61mg/mL.

1.1.9.7. Atividade enzimática frente a diferentes sais

Foram adicionados ao meio reacional, contendo como substrato o *p*-nitro fenil palmitato, 1µL de $Pb(C_2H_3O_2)_2$, $MgCl_2$, $CaCO_3$, Na_2CO_3 , $CoCl_2$, nas concentrações de 1 M no meio, para medida de atividade que foi determinada como anteriormente descrito (1.1.6. parte b) .

1.1.9.8. Atividade enzimática frente a diferentes solventes

Foram adicionados ao meio reacional, contendo como substrato o *p*-nitro fenil palmitato, 1µL de acetona, éter, metanol, diclorometano, no meio, para medida de atividade que foi determinada como anteriormente descrito (1.1.6. parte b).

1.1.9.9. Purificação parcial

Com o objetivo de purificar parcialmente a lipase produzida por *Penicillium roqueforti* e verificar o efeito do processo de precipitação por sulfato de amônio sobre a atividade lipásica, foram realizadas cinco condições de saturação (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%). Para o processo de precipitação por sulfato de amônio seguiu-se a metodologia descrita por England e Seifter (1990).

A volumes de 50 mL do extrato enzimático bruto foram adicionadas, lentamente, quantidades determinadas de sulfato de amônio, sob agitação em banho de gelo, até obter as saturações pretendidas. Em seguida, as amostras foram mantidas refrigeradas em geladeira por 1 hora. Decorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas a 15000 g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi removido, e o precipitado ressuspendido em 1 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0. Após, o volume final foi medido, e as análises de atividade lipásica e proteína total foram realizadas. A eficiência do processo de precipitação com sulfato de amônio foi avaliada pela recuperação da atividade enzimática.

1.1.9.10. Proteína total

A determinação da concentração de proteína no extrato bruto foi realizada por método colorimétrico conforme metodologia descrita por Lowry et al. (1951). Este método baseia-se na produção de um composto azul formado a partir da reação entre o reagente Folin-Ciocalteu e o complexo cobre-proteína. Os dados de absorvância foram medidos utilizando espectrofotômetro a 660 nm e albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão de proteína, para a construção da curva de calibração.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Caracterização físico-química do substrato

Neste trabalho o substrato utilizado foi o farelo de cacau, cedido por fábricas de chocolate localizadas na região sul da Bahia. A produção de enzimas é induzida pela presença de nutrientes no substrato. Sendo assim é muito importante realizar a caracterização físico-química do resíduo utilizado.

Partindo dessa premissa foram realizadas análises físico-químicas tais como, matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE) (tabela 3), para traçar a composição bromatológica do farelo, além de constatar se esse substrato é um promissor produtor de lipase.

Tabela 3: Composição bromatológica quanto aos valores de matéria seca (MS%), matéria mineral (MM %), proteína bruta (PB %), fibra bruta (FB %), fibra em detergente ácido (FDA %) e fibra em detergente neutro (FDN %), do substrato (farelo de cacau) a ser utilizado como matriz na fermentação em estado sólido. Os valores determinados em triplicata foram expressos em % (g/100g de matéria seca).

Componentes bromatológicos	Farelo de Cacau % (g/100g)
Matéria seca (MS)	89,91±0,03
Matéria mineral (MM)	6,87±0,09
Proteína Bruta (PB)	12,15±0,28
Fibra Bruta (FB)	25,1±0,32
Fibra em detergente neutro (FDN)	43,1±0,2
Fibra em detergente ácido (FDA)	36,18±0,24
Extrato etéreo (EE)	14,32±0,05

Com base nos resultados obtidos, pode-se considerar que o farelo de cacau é um meio rico em nutrientes, tanto como fonte de carbono e nitrogênio, necessários para o crescimento dos microrganismos, bem como a capacidade dos mesmos de produzirem a enzima de interesse. Desta forma o farelo de cacau possui potencial suficiente para ser utilizado como a matriz sólida para a fermentação sólida e obtenção de lipase.

2.2 Perfil fermentativo

A determinação do perfil fermentativo foi realizado a fim de se obter um tempo ótimo, para a produção de lipase. O processo fermentativo procedeu fixando uma atividade de água e temperatura ideais para crescimento do fungo filamentosso *Penicillium roqueforti*, uma vez que cada microrganismo possui suas especificidades em relação a essas variáveis, sendo a_w 0,7 para fungos, a_w 0,8 para leveduras, a_w 0,9 para bactérias (OLIVEIRA, 2013). A temperatura é um fator crítico na FES, uma vez que os fungos filamentosos possuem atividades metabólicas mesófilas, e o crescimento dos mesmos estão associados às temperaturas entre 25 e 35°C (SANTOS, *et al*, 2011) . Logo a temperatura utilizada foi à indicada no manual de cultivo enviado pela FIOCRUZ, 26,5°C e atividade de água (a_w) 0,854, que está dentro da faixa de a_w ideal para crescimento do gênero *Penicillium* apontada por (Pitt & Hocking, 2009). A figura 3 apresenta o perfil fermentativo pela fermentação sólida do farelo de cacau, pelo fungo *Penicillium roqueforti* para obtenção de lipase.

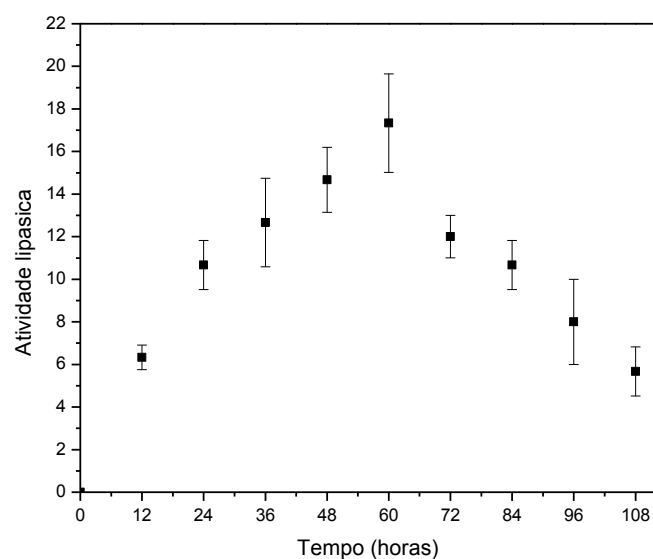


Figura 3: Perfil fermentativo pela fermentação sólida do farelo de cacau, pelo fungo *Penicillium roqueforti* para obtenção de lipase, 26,5°C e atividade de água (aw) 0,854.

O perfil fermentativo demonstrou que a maior atividade lipásica ocorreu no tempo de 60 horas apresentando uma atividade de 17,33 U/g, seguido de um decréscimo de valores de atividade, isso por sua vez pode estar relacionado com o consumo do teor umidificante do meio pelo *Penicillium roqueforti*, para a manutenção de sua vida útil no processo fermentativo, além do consumo de nutrientes e provavelmente redução significativa no teor de lipídeos. Diante disso a atividade enzimática tende a cair no decorrer das horas, levando a conclusão de que está havendo uma redução de nutrientes, que em consequência leva ao decréscimo no crescimento microbiano e excreção de enzimas (AMORIM, *et.al* 2012).

2.3. Otimização da obtenção de lipase

Para o estudo de otimização da obtenção de lipase, realizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR), a fim de que os principais efeitos das variáveis temperatura e atividade de água fossem avaliados, além da otimização dos valores de atividade enzimática. A tabela 3, apresenta a matriz do DCCR, com os valores reais, codificados e a resposta para a atividade de lipase em U/g. A partir da análise dos resultados foram aplicados à metodologia da superfície de resposta (MSR).

Verifica-se que os maiores valores de atividade lipásica, estão nos pontos centrais (15,33, 15,66, 14,33 U/g), no ensaio 3 (17,33 U/g) e no 4 (16 U/g), conforme observado na Tabela 3. Dessa forma os resultados obtidos, sugerem condições ótimas para a produção da lipase em torno de 22-28°C e qualquer valor de a_w analisado. A análise de Pareto (Figura 9) revelou que a 95% de significância os termos estatisticamente significativos para o modelo quadrático são temperatura (linear e quadrática) e atividade de água (quadrática). Assim, removendo-se os termos não significativos, procedeu-se à Análise da Variância (ANOVA) (Tabela 4) que revelou o valor de F calculado foi maior que o valor de F tabelado, e a falta de ajuste não foi significativa, além de mostrar um valor de coeficiente de determinação de 0,883 indicando que 88,3% dos valores experimentais podem ser explicados pelo modelo matemático, sendo este significativo estatisticamente.

Portanto, o modelo quadrático estatisticamente significativo a 95% de confiança que descreve a produção de lipase por *Penicillium roqueforti* em farelo de cacau é apresentado como a Equação 4.

Tabela 3: Matriz Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR, 2^3) com seus níveis reais e codificados (em parênteses) das variáveis independentes, temperatura (°C) e atividade de água (a_w), e variável resposta, Atividade lipásica (U/g), para otimização da obtenção de lipase por *Penicillium roqueforti*, em 10g de farelo de cacau, 10^7 esporos/g, em estufa microbiológica (BOD), por 60 horas de fermentação.

Experimentos	Variáveis		
	A_w	Temperatura (°C)	Atividade lipásica (U/g)
1	0,864 (-1)	17,18 (-1)	7±0,1
2	0,913 (+1)	17,18 (-1)	8,33±0,17
3	0,864 (-1)	27,81 (+1)	17,33±0,27
4	0,912 (+1)	27,81 (+1)	16±0,4
5*	0,888 (0)	22,5 (0)	15,33±0,52
6*	0,888 (0)	22,5 (0)	15,66±0,35
7*	0,888 (0)	22,5 (0)	14,33±0,43
8	0,854 (-1,41)	22,5 (0)	10,66±0,54
9	0,923 (+1,41)	22,5 (0)	12,33±0,57
10	0,888 (0)	15 (-1,41)	7,33±0,77
11	0,888 (0)	30 (+1,41)	13,33±0,32

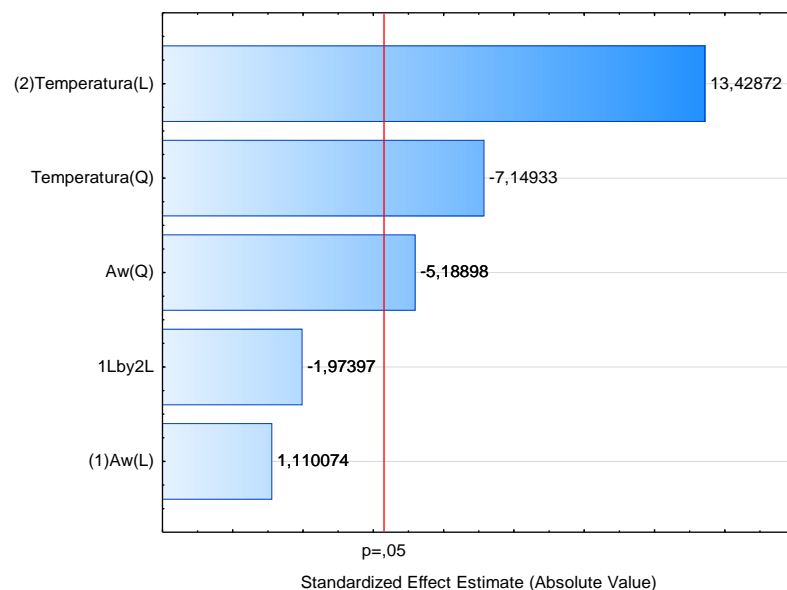


Figura 4: Diagrama de Pareto, para a temperatura (TP) e atividade de água (Aw) para otimização da obtenção de lipase por *Penicillium roqueforti*, em 10g de farelo de cacau, 10^7 esporos/g, em estufa microbiológica (BOD), por 60 horas de fermentação. Os dados foram obtidos com o software Statistica ® 10.

Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) pela Matriz Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR, 2^3) em 95% de intervalo de confiança.

Fonte de Variação	SQ	gl	MQ	F calculado	F tabelado	P
Regressão	119,5548	5	23,91096	7,5490	5,0532	0,050
Resíduo	15,8371	5	3,167429			
Falta de ajuste	14,8779	3	5,10367	10,640	19,164	0,0894
Purro erro	0,9593	2	0,47963			
SQ total	135,3920	10				
R ²	0,8830					

GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; R² = Coeficiente de Determinação; P= Nível de probabilidade.

$$\text{Atividade lipásica} \left(\frac{U}{g} \right) = 15,125 - 3,0325Aw^2 + 3,2927T - 2,0922T^2$$

(Equação 4)

Onde:

A_w = atividade de água (a_w)

T = temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

Como os resultados, validaram estaticamente o modelo, permitiu a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na figura (5).

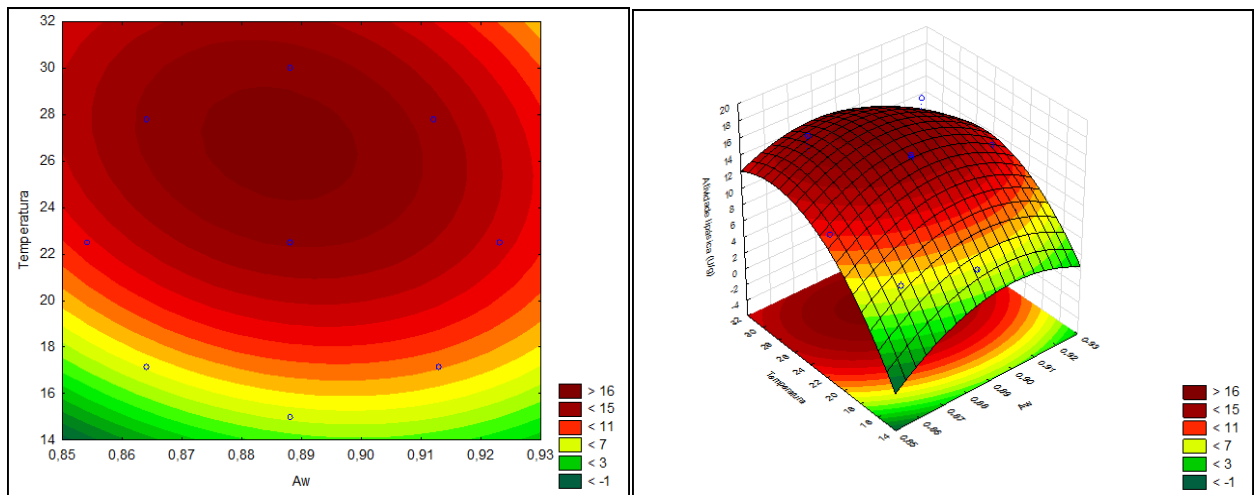


Figura 5: Superfície de contorno e de resposta para a otimização da obtenção de lipase por *Penicillium roqueforti*, em 10g de farelo de cacau, 10^7 esporos/g, em estufa microbiológica (BOD), por 60 horas de fermentação. Os dados foram obtidos com o software Statistica $\text{\textcircled{R}}$ 10.

Na figuras 5 pode-se observar uma região de ótimo para a produção de lipase, essa região contempla uma faixa de a_w de 0,864 à 0,888 e temperatura de 22,5 $^{\circ}\text{C}$ à 27,81 $^{\circ}\text{C}$, na qual encontram-se os melhores valores de atividade lipásica.

Os resultados foram validados, com a repetição em triplicata dos valores críticos apontados pelo modelo, sendo 60 horas de fermentação com a_w 0,886 e temperatura 26,75 $^{\circ}\text{C}$, apontando uma atividade lipásica de 16,43 U/g. O valor médio de atividade lipásica na repetição foi de 17,93 U/g, estando em concordância com o valor previsto pelo modelo.

Khayati, Gh *et al.* (2012) utilizando palha de arroz enriquecida com óleo e ureia com o fungo *Rhizopus Oryzae*, conseguiram uma atividade lipásica máxima de 56,44 U/g. Em contra partida Ferraz et al. (2012) encontrou atividades de lipase de cerca de 130,1 U/g, 164,2 U/g e 189,5 U/g foram obtidos utilizando soja, bagaço de cana e farelo de arroz como substratos, sem suplementação, respectivamente, a 30 $^{\circ}\text{C}$ e 60% de

umidade, por 72h de fermentação a partir do *Sporobolomyces ruberrimus*. Vaseghi, Z *et al.*(2012) encontraram um máximo de produção lipásica (215 U/g) em 72h de fermentação do bagaço de cana a uma temperatura de 45°C , empregando o fungo *Rhizopus oryzae*.

A temperatura é uma variável muito importante no processo de fermentação em estado sólido, pois a mesma está intimamente ligada ao transporte de massa e com a transferência de oxigênio, logo corrobora para o decréscimo no crescimento dos microrganismo, esporulação e em consequência a excreção das enzimas (WANG, YANG 2007). As variáveis estudadas e otimizadas, e a região de ótimo obtida é de suma importância industrial, uma vez que esses processos primam pela economia energética e processos sem suplementação.

2.4 Caracterização do extrato enzimático bruto

2.4.1 Determinação do pH e temperatura ótimos

O estudo das características bioquímicas das enzimas é importante para conhecer suas especificidades, para encaminha-las à aplicação industrial mais adequada. A determinação da temperatura e pH ótimo é uma característica primordial a ser estudada para sua utilização em bioprocessos.

Nesse estudo foi utilizado delineamento composto central (DCCR 2³), para determinação da temperatura e pH ótimos da lipase de *Penicillium roqueforti*. a fim de que os principais efeitos das variáveis temperatura e pH fossem avaliados, além da otimização dos valores de atividade enzimática. A tabela 5, apresenta a matriz do DCCR 2³, com os valores reais, codificados e a resposta para a atividade de lipase em U/g. A partir da análise dos resultados foram aplicados à metodologia da superfície de resposta (MSR).

Tabela 5: Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR 2³) com seus níveis reais e codificados (em parênteses) das variáveis independentes temperatura (°C) e pH e valores obtidos para a variável resposta, atividade lipásica (U/g), de *Penicillium roqueforti* cultivado em em 10g de farelo de cacau, 10⁷ esporos/g, em estufa microbiológica (BOD), 60 horas de fermentação com a_w 0,886 e temperatura 26,75°C, apontando uma atividade lipásica de 16,43 U/g.

Experimentos	Variáveis		
	pH	Temperatura (°C)	Atividade lipásica (U/g)
1	5,43 (-1)	24,36 (-1)	2,8
2	7,56 (+1)	24,36 (-1)	7,5
3	5,43 (-1)	45,63 (+1)	6,6
4	7,56 (+1)	45,63 (+1)	1,66
5*	6,5 (0)	35 (0)	12,8
6*	6,5 (0)	35 (0)	14,5
7*	6,5 (0)	35 (0)	16,2
8	5 (-1,41)	35 (0)	1,66
9	8 (+1,41)	35 (0)	12,4
10	6,5 (0)	20 (-1,41)	2,33
11	6,5 (0)	50 (+1,41)	0

A análise de Pareto (Figura 6) revelou que a 95% de significância os termos estisticamente significativos para o modelo quadrático são temperatura (quadrática) e pH (quadrática). Assim, removendo-se os termos não significativos, procedeu-se à Análise da Variância (ANOVA) (Tabela 6) que revelou o valor de F calculado foi maior que o valor de F tabelado, e a falta de ajuste não foi significativa, além de mostrar um valor de coeficiente de determinação de 0,8937, logo os resultados conseguem explicar 89,3% do modelo matemático. Após a validação do modelo através da ANOVA, pode-se obter o modelo de segunda ordem (equação 4) que representa a atividade lipásica em relação aos valores de temperatura e pH.

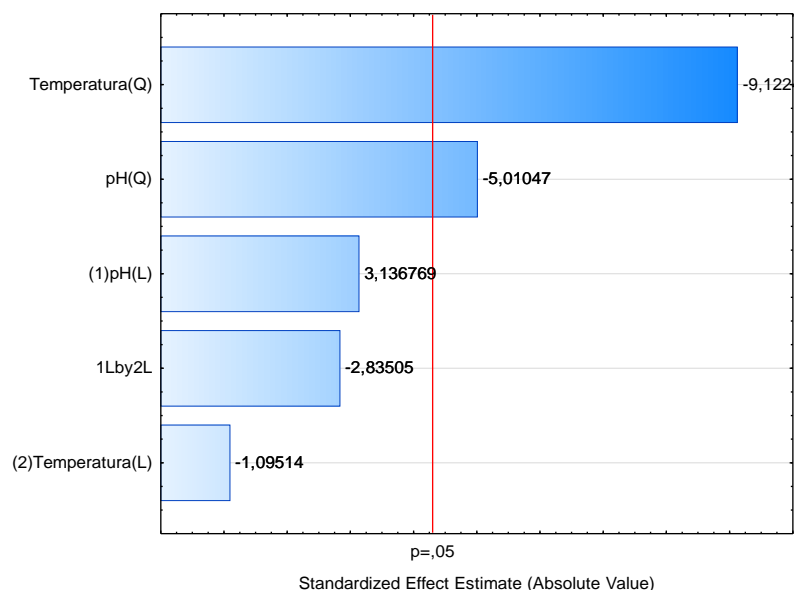


Figura 6: Diagrama de Pareto, para a temperatura (TP) e pH para a caracterização da lipase de *Penicillium roqueforti*, cultivado em 10g de farelo de cacau, 10^7 esporos/g, em estufa microbiológica (BOD), 60 horas de fermentação com aw 0,886 e temperatura 26,75° C, apontando uma atividade lipásica de 16,43 U/g. Os dados foram obtidos com o software Statistica ® 10.

$$\text{Atividade lipásica (U/g)} = 14,479 - 3,584pH^2 - 6,5260TP^2 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

pH= potencial hidrogeniônico

TP= temperatura (°C)

Tabela 6: Análise de variância (ANOVA) pela Matriz Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR, 2^3) em 95% de intervalo de confiança.

Fonte de Variação	SQ	gl	MQ	F calculado	F tabelado	P
Regressão	312,53	5	62,506	8,479	5,053	0,005
Resíduo	36,86	5	7,3716			
Falta de ajuste	31,0783	3	10,359			0,225
Purro erro	5,7800	2	2,89			
SQ total	349,3890	10				
R²	0,89					

GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; R² = Coeficiente de Determinação.

Como os resultados, validaram estaticamente o modelo, permitiu a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na figura (7).

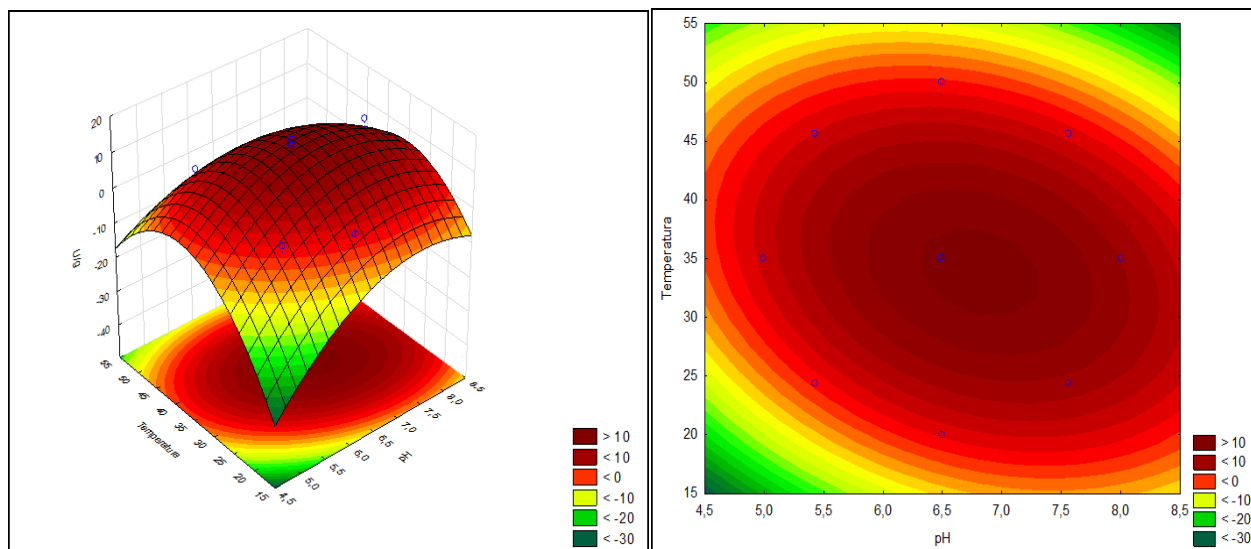


Figura 7: Superfície de contorno e de resposta para a otimização para a temperatura (TP) e pH para a caracterização da lipase de *Penicillium roqueforti*, cultivado em 10g de farelo de cacau, 10^7 esporos/g, em estufa microbiológica (BOD), 60 horas de fermentação com a_w 0,886 e temperatura $26,75^\circ\text{C}$, apontando uma atividade lipásica de 16,43 U/g. Os dados foram obtidos com o software Statistica® 10.

O modelo apresenta um valor máximo de atividade lipásica para as variáveis em estudo sendo pH 6,8 e temperatura $33,8^\circ\text{C}$. Os resultados obtidos indicaram que a lipase de *P. roqueforti* apresenta caráter básico. Os resultados foram validados, com a repetição em triplicata dos valores críticos apontados pelo modelo, sendo pH 6,8 e temperatura $33,8^\circ\text{C}$, apontando uma atividade lipásica de 14,79 U/g. O valor médio de atividade lipásica na repetição foi de 15,53 U/g, estando em concordância com o valor predito pelo modelo.

Segundo Lima, et al (2004), a maioria dos fungos e leveduras que produzem lipases tem geralmente melhores valores de atividade em pH neutro ou alcalino. Supakdamrongkul, P. et al (2010), encontraram a atividade máxima de lipase fúngica de *Nomuraea rileyi* MJ, temperatura ótima de 35°C .

Dheeman, D.S. et al (2011), produziram uma lipase de *Penicillium* sp. com atividade máxima em pH ótimo na faixa de 5,5 a 6 e temperatura 45°C . As lipases produzidas pelo gênero *Penicillium* são mais ativas em pHs alcalinos (FERRER, M. et al 2000).

Através desses dados apresentados e informações de outros autores é possível inferir que as lipases produzidas por diferentes fungos filamentosos, tem diferentes faixas de temperatura e pH ótimos de atuação. O que corrobora para a utilização dessas em diversas aplicações industriais.

2.4.2. Termoestabilidade

A termoestabilidade é um dos aspectos que interfere na eficácia dos complexos enzimáticos, sendo a característica que define tempo de meia vida utilizada para avaliar tal propriedade. É uma característica importante para enzimas com aplicações industriais, visto que em alguns processos utiliza-se faixas de temperaturas altas que podem degradar a enzima (ZHANG, J. et al 2011). Os resultados obtidos da termoestabilidade de *Penicillium roqueforti* podem ser observados na figura 6. Foi considerado 100% de atividade relativa, a amostra sem aquecimento.

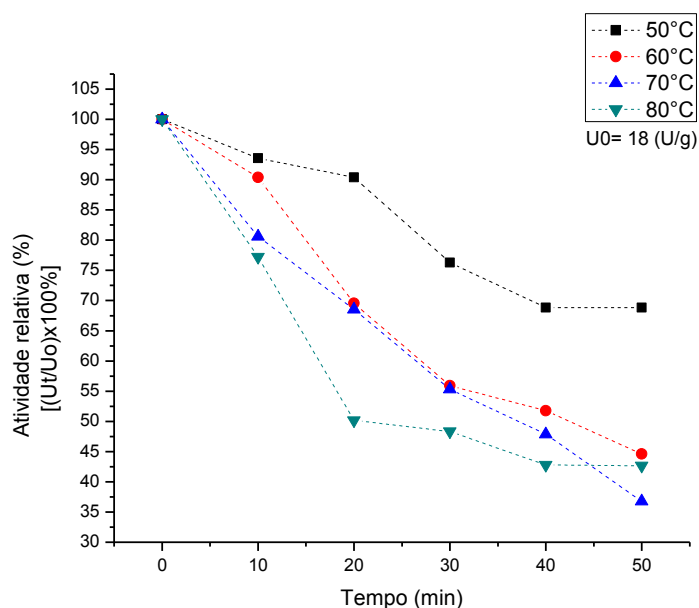


Figura 8: Termoestabilidade da lipase de *Penicillium roqueforti*.

A lipase apresentou-se estável em 50°C, mantendo por 30 min, aproximadamente 80% de sua atividade, seguido de um decréscimo, que em seguida se tornou praticamente constante dos 40 a 50 min. Em 60°C e 70°C a enzima permaneceu

estável por 20 min, apresentando 65% de sua atividade. Em 80°C a enzima perdeu rapidamente a atividade, mantendo apenas 30% , durante o tempo de incubação total. A lipase em estudo se mostrou termoestável, uma vez que conseguiu manter mais de 50 % sua atividade em 50, 60 e 70°C, por 40 min.

Fleuri, L.F. et al (2014) apresentaram uma lipase de *Aspergillus sp*, que a 40 e 60 ° C mostraram atividade de 69% e 89%, e permaneceu estável a 60°C. Ülker e Karaoglu (2012); avaliaram a termoestabilidade de lipase purificada de *Mucor hiemalis f. Corticola* em temperaturas de 30 a 80°C e observaram que a enzima reteve 50% de atividade a 50°C por até 90 minutos de incubação.

2.4.3. Estabilidade ao congelamento da biomassa fermentada

A estabilidade da enzima quanto ao congelamento da biomassa fermentada, é um parâmetro importante a ser observado, para avaliar o tempo que a enzima resiste mantendo sua atividade inicial.

Nesse estudo verificou por 90 dias, a atividade lipásica da biomassa congelada a -4°C, sendo avaliado a cada 10 dias, como identificado na figura 7.

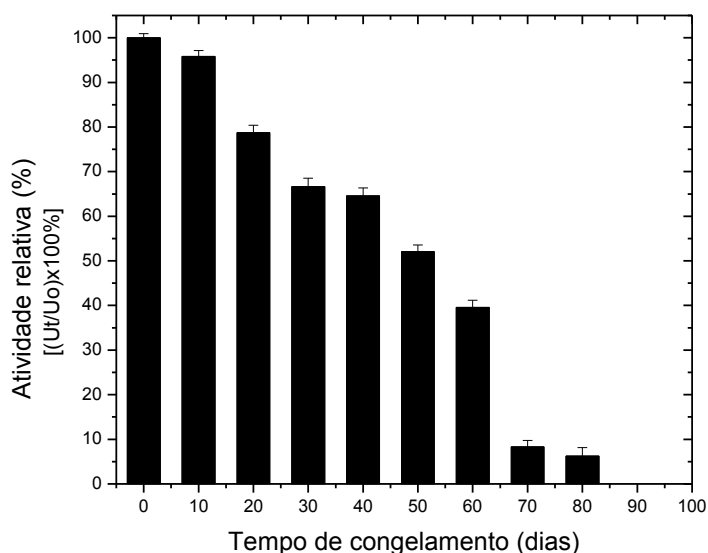


Figura 9: Estabilidade da biomassa fermentada da lipase de *Penicillium roqueforti*. em 10g de farelo de cacau, 10⁷ esporos/g, em estufa microbiológica (BOD), por 60 horas de fermentação com aw 0,886 e temperatura 26,75°C, apontando uma atividade lipásica de 18 U/g. Os dados foram obtidos com o software OriginPro 8.

Verifica-se que a biomassa fermentada, manteve mais de 50% sua atividade até os primeiros 40 dias de congelamento, seguido de um decréscimo e logo em seguida um novo pico de atividade. Na penúltima retirada para análise, a atividade já demonstra um decaimento, seguido de uma inativação total aos 90 dias. A partir desses resultados, pode-se inferir que a enzima apresenta um perfil estável, uma vez que a mesma resiste até 50% de sua atividade inicial por 50 dias. Sugere-se a investigação de outros tampões ou sais ou até mesmo a liofilização para aumentar essa estabilidade, para que possa vir a ser utilizada em processos industriais, no entanto este tempo é suficiente para um estoque rápido.

2.4.4. Estabilidade ao congelamento do extrato enzimático bruto

É comum realizar o congelamento para o armazenamento de proteínas, inclusive em ultrafreezer a -80°C . Porém congelar extratos enzimáticos pode causar uma desnaturação estrutural, seguidos de perda de atividade (HELLER *et al*, 1997).

Diante disso vê-se a necessidade de avaliar o extrato enzimático bruto, quanto ao seu congelamento em -4°C , por 90 dias, sendo avaliados a cada 10 dias, como mostra a figura 8.

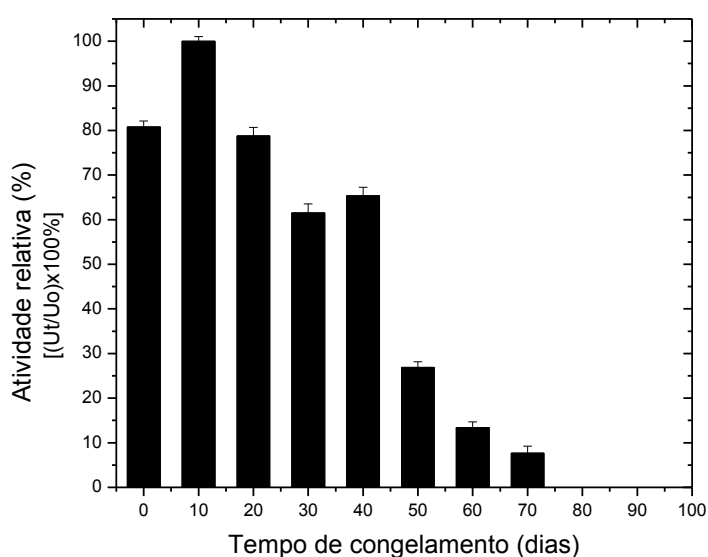


Figura 10: Estabilidade ao congelamento do extrato enzimático bruto congelado, da lipase de *Penicillium roqueforti* em 10g de farelo de cacau, 10^7 esporos/g, em estufa

microbiológica (BOD), por 60 horas de fermentação com a_w 0,886 e temperatura 26,75°C, apontando uma atividade lipásica de 18 U/g. Os dados foram obtidos com o software OriginPro 8.

Lazari, S. A., 2010, em seus estudos com lipase, observou que a mesma perdeu sua atividade do extrato bruto de lipase de *S. thermophilum*, após 1 dia a -20°C. Verificou também que a enzima mantida em geladeira a atividade também decaiu rapidamente, retendo 50% do valor inicial em 7 dias. Diante disso corrobora que a lipase de *Penicillium* no presente trabalho é mais estável uma vez que manteve mais de 60 % de sua atividade por 40 dias e perdeu sua atividade total só após os 70 dias de congelamento em geladeira. Partindo do pressuposto que o *Penicillium* não é um psicotrófico, ele é mesófilo então é de se esperar que suas enzimas não estejam tão ativas em baixas temperaturas.

2.4.5. Atividade lipásica frente de diferentes substratos

As lipases são caracterizadas pela capacidade de catalisar e hidrolisar ligações ésteres de ácidos carboxílicos, sendo estes triacilgliceróis de cadeia longa (mais de 10 carbonos). Essas características permitem uma especificidade em relação às cutinases e demais estereases. Dessa forma as lipases são capazes de hidrolisar cadeias lipídicas de óleos das mais variadas composições (LIMA, et al., 2004). Uma enzima pode apresentar diferentes taxas de hidrólise sobre os triacilgliceróis, principalmente quanto ao comprimento da cadeia e número de insaturações (JENSEN et al., 1983). Diante disso observou-se a atividade lipásica do extrato enzimático produzido frente a a diferentes substratos, tais como óleos vegetais (azeite de oliva , óleo de soja , óleo de soja de fritura, azeite de dendê e azeite de dendê de fritura) e o *p*-nitro fenil palmitato, conforme apresentado na figura 9.

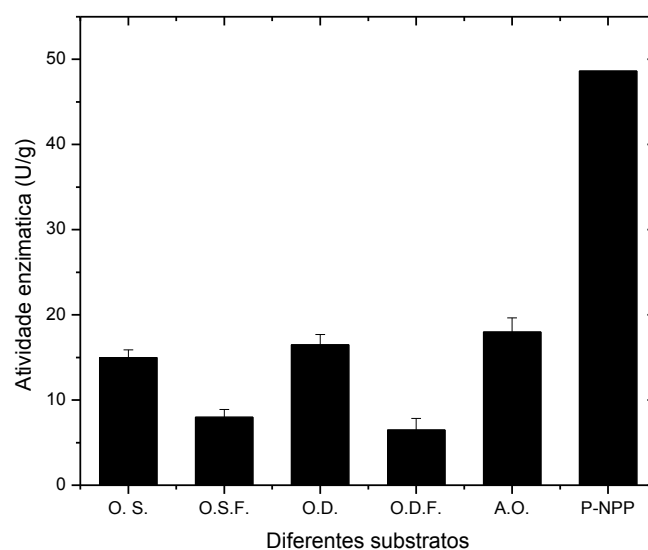


Figura 11: Atividade lipásica frente a diferentes substratos, (O.S.) Óleo de soja, (O.S.F) Óleo de soja de fritura, (O.D.) Óleo de dende, (O.D.F) Óleo de dende de fritura, (A.O.) Azeite de oliva, (P-NPP) *p*-nitro fenil palmitato, da lipase de *Penicillium roqueforti* em 10g de farelo de cacau, 10^7 esporos/g, em estufa microbiológica (BOD), por 60 horas de fermentação com a_w 0,886 e temperatura 26,75°C. Os dados foram obtidos com o software OriginPro 8.

Os fatores que mais influenciam na atividade das lipases é o tamanho da cadeia carbônica, número de insaturações e acidez acentuada nos óleos residuais. A lipase apresentou melhores atividades frente ao azeite de oliva (18 U/g), com o aumento de instauração no óleo de soja caiu para (15 U/g), o dendê que possui a menor cadeia (16,5 U/g), os óleos residuais soja e dendê (6,5 e 8U/g). Diante disso obtiveram-se resultados satisfatórios uma vez que a lipase produzida foi capaz de hidrolisar todos os óleos. Além de apresentar uma atividade lipásica satisfatória frente ao *p*-NPP, que é um substrato sintético. Portanto, a lipase em estudo pode-se dizer verdadeira, além de possuir um grande potencial para diferentes aplicações industriais.

2.2.6. Determinação dos parâmetros cinéticos K_M aparente e V_{max} aparente

Para a determinação dos parâmetros cinéticos de extratos enzimáticos de lipase requer um cuidado rigoroso, por se tratar de uma emulsão, de viscosidade alta, logo o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima é considerado um fator de restrição (BALCÃO & MALCATA, 1996). Os valores das constantes cinéticas foram

determinados variando-se a concentração dos substratos na reação enzimática. Dentre eles o substrato padrão (azeite de oliva) na reação enzimática, além dos outros óleos vegetais, soja, dendê, óleo de soja de fritura e óleo de dendê de fritura e do substrato *p*-nitrofenil-palmitato . A faixa escolhida para determinação foi de 10 a 50 g/L de óleo adicionado ao meio reacional. Para o substrato *p*-nitrofenil-palmitato as concentrações foram, 1mg/mL, 31mg/mL, 41mg/mL, 51mg/mL, 61mg/mL.

Segundo SEGEL (1979), quanto maior valor de K_m menor a afinidade do substrato pela enzima. O K_m é definido como a concentração de substrato necessária para que a velocidade da reação enzimática seja a metade da máxima (V_{max}). Em alguns casos, mudanças nas condições de reação, como pH ou temperatura, podem ter influencia no valor de K_m (COPELAND, 2000). Os valores obtidos nesse estudo para as constantes de afinidade pelo substrato (K_m) e a velocidade máxima de reação (V_{max}) podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7: Valores das constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para lipases *Penicillium roqueforti* em 10g de farelo de cacau, 10^7 esporos/g, em estufa microbiológica (BOD), por 60 horas de fermentação com a_w 0,886 e temperatura 26,75°C.

Substratos	K_M aparente	V_{max} aparente
Azeite de Oliva	7,58 g/mL	17,6
Óleo de Soja	3,44 g/mL	15,77
Óleo de Soja de fritura	4,46 g/mL	20,32
Óleo de Dendê	8,45 g/mL	19,34
Óleo de Dendê de fritura	9,56 g/mL	16,9
P-NPP	0,788 g/mL	37,17

Campos, AN. G.S. *et.al.*, (2015), utilizando lipase de pâncreas de porco comercial, encontrou valores de V_{Max} e K_m de 200 U/g e 45,82 mM, respectivamente. Gomes, F.M., *et. al.*, (2006) trabalhando com lipase de *Candida rugosa* K_m 560,3 V_{max} 3937,6.

2.2.7 Atividade enzimática frente a diferentes sais

A presença de diferentes íons em reações enzimáticas pode influenciar positivamente ou negativamente na eficiência de tal ligação, podendo o íon funcionar como inibidor da ligação, diminuindo a atividade enzimática, ou como ativador da

ligação, aumentando a atividade enzimática. Tal fato pode ocorrer, pois os íons podem levar a desnaturação da enzima se afetarem sua estrutura espacial. Entretanto, também pode ocorrer o aumento da atividade enzimática na presença de um determinado íon, pois este pode agir como indutor da enzima agindo como uma espécie de cofator que auxilia na ligação com o substrato, o que aumenta a atividade enzimática (NELSON; COX, 2011). Foram adicionados ao meio reacional, contendo como substrato o p-nitro fenil palmitato, 1µL de $Pb(C_2H_3O_2)_2$, $MgCl_2$, $CaCO_3$, Na_2CO_3 , $CoCl_2$, nas concentrações de 1 M no meio, para a observação da influencia desses íons na atividade lipásica. O extrato utilizado apresentou atividade 48,64 U/g. Os resultados obtidos podem ser observadas na tabela 8.

Tabela 8: Valores das atividades lipásicas frente a diferentes sais.

Sais	Atividade Lipásica (U/g)
$MgCl_2$	50,52
$Pb(C_2H_3O_2)_2$	52,49
$CaCO_3$	15,69
Na_2CO_3	5,64
$CoCl_2$ II	78,19

Os sais $MgCl_2$, $Pb(C_2H_3O_2)_2$ e $CoCl_2$ II atuaram como ativadores da lipase de *Penicillium roqueforti*, uma vez que a atividade enzimática aumentou consideravelmente. Enquanto que os demais $CaCO_3$ e Na_2CO_3 se comportaram como inibidores. As alterações da atividade lipolítica (ativação ou inibição) frente aos sais pode ser justificada pelo fato de que tais íons geralmente formam complexos com os ácidos graxos, mudando sua solubilidade e comportamento nas interfaces (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009). No entanto, a influência dos íons metálicos na atividade lipolítica depende da origem de cada lipase (LI; ZONG, 2010).

2.2.8. Atividade enzimática frente a diferentes solventes

Foram adicionados ao meio reacional, contendo como substrato o p-nitro fenil palmitato, 1µL de acetona, éter, metanol, diclorometano, ao meio para avaliar seu efeito

na atividade lipolítica. O extrato utilizado apresentou atividade 48,64 U/g. Os resultados para a atividade lipolítica estão expressos na tabela 9.

Tabela 9: Valores das atividades lipásicas frente a diferentes solventes.

Solventes	Atividade lipásica (U/g)
Acetona	25,64
Eter etílico	56,39
Metanol	15,69
Diclorometano	79,10

Observa-se que o éter etílico e o diclorometano se comportaram como ativadores da lipase e os demais acetona e metanol como inibidores. Demir; Tükel, (2010) descreveram uma lipase que apresentou instabilidade frente aos solventes, metanol e acetona, corroborando com este estudo. A estabilidade de enzimas na presença de solventes orgânicos é uma característica extremamente importante, uma vez que a maioria das enzimas são facilmente desnaturadas e inativadas na presença dos mesmos. No entanto, se as enzimas forem naturalmente estáveis e apresentarem uma atividade significativa na presença de solventes, as mesmas se tornam substanciais para diversas aplicações industriais. No caso de enzimas lipolíticas, tais enzimas seriam úteis para deslocar o equilíbrio termodinâmico para o caminho inverso da reação de hidrólise, ou seja, o caminho de síntese (DOUKYU; OGINO, 2010; TOMBINI, 2015).

2.2.9. Purificação parcial

O extrato enzimático bruto foi ainda avaliado quanto a etapa de concentração da atividade de lipase por precipitação com sulfato de amônia $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, as recuperações (R , %) obtidas são apresentadas na Tabela 10. De acordo com os resultados obtidos, a maior recuperação ($R > 70\%$) foi obtida com 40-60% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Considerando lipases de *Aspergillus* e o mesmo sal precipitante, foram relatadas recuperações maiores ($R = 90\%$) com uma concentração de sal maior (90%) por Mhetras et al. (2009) e menores ($R = 44\%$) com a mesma concentração de sal (60%) por Muruci (2012). De acordo com Maldonado et al. (2015), recuperações acima de

100% foram obtidas com a precipitação (mesmo sal, porém a 80%) seguida da liofilização de lipases de *Geotrichum candidum* NRRLY-552. Maiores purezas podem ser obtidas com as mais diferentes combinações de técnicas, especialmente as cromatográficas, porém a medida que se aumentam a pureza e o número de etapas de processos, aumenta-se o custo do processo.

Tabela 10: Avaliação da recuperação enzimática obtidos para a técnica de concentração por precipitação com sulfato de amônio 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% de saturação. Atividade específica.

Precipitação	Atividade lipásica (U/g)	Atividade específica (U/μg)	Recuperação
Extrato Bruto	48,64	0,106	100%
0-20%	32,14	0,0105	66,07%
20-40%	28,44	0,0158	58,47%
40-60%	34,67	0,0233	71,28%
60-80%	30,04	0,0216	61,76%
80-100%	28,12	0,0156	57,81%

Observa-se que a maior recuperação ocorreu na fração 40-60% de saturação com sulfato de amônio. Mhetras, Bastawde e Gokhale (2009) realizaram a pré-purificação de lipase de *Aspergillus niger* NCIM 1207 por precipitação com sulfato de amônio a 90% e posterior purificação por cromatografia em gel. Na etapa de pré-purificação os autores obtiveram recuperação de 99,05%. Muruci, 2012, realizou a pré-purificação de lipase de *Aspergillus niger* 40-60% e obteve 44% de recuperação.

3 CONCLUSÃO

A aplicação do farelo de cacau como substrato para o cultivo do fungo *Penicillium roqueforti* (um fungo aplicado na fabricação de queijos) e sua consequente produção de lipases apresenta vantagens. A utilização de um resíduo agroindustrial, abundante na região Sul da Bahia (Brazil), contribui para a diversificação da economia

local assim como de técnicas biotecnológicas. Além disso, a aplicação de técnicas simples na obtenção de um preparado enzimático com boa atividade de lipase é vantajosa em comparação com técnicas como fermentações submersas e/ou purificação cromatográfica. Portanto, o extrato enzimático obtido apresentou atividade de lipase com características muito semelhantes a outras lipases descritas na literatura e sua purificação parcial é promissora.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, G. M.; SANTOS, T. C.; PACHECO, C. S. V.; BARRETO, I. M. A.; FREIRE, D. M. G.; FRANCO, M. Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, 8(1):24-27, janeiro-junho 2012.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; Malcata, F. X.; *Enzyme Microb. Technol.* 1996, 18, 392.

COPELAND, R. A. **Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis**. 2 ed. New York: Wiley-VCH, 2000. p. 397.

DHEEMAN, S. D.; BABUB, A. S.; FRIAS, J. M.; HENEHANA, G. T. M. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 256– 262, 2011.

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

FERRAZ, L.R.; OLIVEIRA, D.S.; SILVA, M.F.; RIGO, E.; Di LUCCIO, M; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using

soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. V. 1, p. 243–252, 2012.

FLEURI, L.F.; NOVELLI, P.K.; DELGADO, C.H.O.; PIVETTA, M.R.; PEREIRA, M.S.; ARCURI, M.L.C. & CAPOVILLE, B.L. Biochemical characterisation and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 2585–2591, 2014.

FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A., Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.75, p.569-576, 2000.

KHAYATI, GH.; KIYANI, F., A statistical approach for optimization of lipase production by using rice straw: analysis of different inducers and nitrogen sources effect. **Minerva Biotec**, v. 24, 83-9, 2012.

JENSEN, R.G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. **Lipids**, v.18, p.650-657, 1983.

LAZARI, S. A. **Caracterização bioquímica da atividade lipásica de *Scytalidium thermophilum* RP-250: uma linhagem hipersecretora de lipases**. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

LIESE A, SEELBACH K, WANDREY C, editors. **Industrial biotransformations** **Weinheim**: Wiley-VCH, 2000.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; FONTANA, J. D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 65-71, 2004.

OLIVEIRA, B.H.; CORADI, G.V.; ATTILI-ANGELIS, D.; SCAURI, D. ; LUQUES, AH. P.G.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; NETO, P.O. ; LIMA, V.M.G., Comparison of lipase production on crambe oil and meal by *Fusarium* sp. (*Gibberella fujikuroi* complex). **Europe J. Lipid Science Technology**, v.115, p.1413–1425, 2013.

SEGEL, I.H. **Bioquímica, Teoria e Problemas**. Traduzido Grassiano, D. M. Rio de Janeiro: Livros técnico e científicos, 1979.

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

SALIHUA, A.; ALAM, MD. Z.; ABDULKARIMA, I.M.; SALLEH, M.H.; Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36–44, 2012.

SANTOS, T. C.; ABREU FILHO, G.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao* L.): Obtenção de ligninases. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.32, n.1, p.87- 96, 2011.

SUPAKDAMRONGKUL, P.; BHUMIRATANA, A. ; WIWAT, C.; Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, p.228–235, 2010.

VASEGHI, Z.; NAJAFPOUR, G.D.; MOHSENI, S.; MAHJOUR, S., Production of active lipase by *Rhizopus oryzae* from sugarcane bagasse: solid state fermentation in a tray bioreactor. **International Journal of Food Science and Technology**. V. 48, 283–289, 2013.

Zhang, Y. (2010). Optimisation of lipase production by a mutant of *Candida antarctica* DSM-3855 using response surface methodology. **International Journal of Food Science & Technology**, 695–701.

WANG, W.; YANG, S. Solid State Fermentation and Its Applications. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. Elsevier, 2007, ch. 18, p. 465-489.

CAPÍTULO III

SILVA, T.P. Otimização da esterificação do ácido oleico por lipase de *Penicillium roqueforti* cultivado em farelo de cacau. Ilhéus-BA: UESC, 2016. 77p. (Dissertação: Mestrado em Química – Área de Concentração em Produtos Naturais).

RESUMO

A partir da cultura de *Penicillium roqueforti* em farelo de cacau, foi possível obter um extrato multienzimático que contém uma atividade de lipase não purificada de 48,64 U / g. Este extrato foi aplicado (5 g / 100 mL) para a esterificação do ácido oleico e álcool metílico a uma taxa molar de 1: 6 em diferentes temperaturas (T, ° C) e tempo de reação (t, min) e a conversão esterificação (Y, %), a 100 rpm, foi investigado por um desenho experimental, a partir dos quais foi possível determinar Ys teóricos superiores a 50% em 26,35-27,65 ° C e 85,8-154,2 min, com um ótimo teórico a 27 ° C e 120 min; nestas condições, foi possível obter um Y experimental de $56,07 \pm 7,44\%$, o mesmo valor previsto pelo modelo obtido ($R^2 = 0,9479$). Os resultados mostram um grande potencial, uma vez que altas conversões foram obtidas a partir de um processo simples, sem purificação enzimática ou substratos sintéticos para o cultivo de fungos.

PALAVRAS-CHAVE: Cacau de resíduos, Doehlert Matrix, Solid State de fermentação, otimização.

SILVA, T. P. Optimization of esterification of oleic acid with lipase of *Penicillium roqueforti* grown cocoa meal. Ilheus-BA: UESC, 2016. 77p. (Dissertation: MSc in Chemistry - Area of Concentration in Natural Products).

ABSTRACT

From the cultivation of *Penicillium roqueforti* on cocoa meal, it was possible to obtain an enzymatic extract containing a non-purified lipase activity of 48,64 U/g. This extract was applied (5 g/100mL) on the esterification of oleic acid and methyl alcohol at the molar rate of 1:6 in different temperatures (T , °C) and reaction time (t , min) and the esterification conversion (Y , %), at 100 rpm, was investigated by an experimental design, from which it was possible to determine theoretical Y s higher than 50% at 26.35 – 27.65°C and 85.8 – 154.2 min, with a theoretical optimum at 27°C e 120 min; at these conditions it was possible to obtain an experimental Y of $56.07 \pm 7.44\%$, the same value predicted by the model obtained ($R^2 = 0.9479$). The results show a great potential, since high conversions were obtained from a simple process without enzymatic purification or synthetic substrates for fungi cultivation.

KEYWORDS: Cocoa Residue, Doehlert Matrix, Solid State Fermentation, Optimization.

1 INTRODUÇÃO

As lipases (triacylglycerol acylhydrolases EC 3.1.1.3) são enzimas muito conhecidas por preconizarem reações em interface óleo/água ou em solventes não aquosos, portanto, são biocatalisadores de vasta aplicação industrial, altamente versáteis e eficazes (Jaeger & Reetz, 1998; Sharma et al., 2001). A esterificação realizada por lipases é uma das suas aplicações e trata-se de uma alternativa importante na produção de ésteres que compõem diversos produtos como: bicompostíveis, aromas, etc. (Aravindan et al., 2007; BAJAJ *et al.*, 2010; Stergiou et al., 2013). Diferentes compostos podem ser empregados como substrato biocatalítico na esterificação, como o ácido oleico por exemplo, e na maioria dos processos relatados na literatura empregam-se lipases comerciais, com alto grau de pureza e/ou imobilizadas sendo relatadas conversões de até 80-90% (Hidayat et al., 2016; Pang et al., 2016; dos Santos et al., 2016).

Em comparação com a esterificação química, a esterificação enzimática é conduzida sob condições mais amenas (temperatura próxima à ambiente e pH neutro), o éster obtido é facilmente recuperado e purificado e praticamente não há geração de resíduos (FJERBAEK et al., 2009). Adicionalmente, processos enzimáticos industriais podem tornar-se ainda mais vantajosos e viáveis quando se trata de lipases produzidas por fermentação em estado sólido (FES), pois assim, promove-se o emprego de fontes alternativas de energia que podem reduzir o custo do processo e seu impacto ambiental. O farelo de cacau é um subproduto do processamento do fruto (*Teobroma cacao* sp.) e tem sido investigado por nosso grupo de pesquisa (dados não publicados), dentre outros substratos (Santos et al., 2015, 2013, 2012 and 2011), como substrato alternativo para cultivo microbiológico. Cocoa pod husk também já foi sugerido como suporte para imobilização de lipases na transesterificação de óleo vegetal para produção de biodiesel (Khanahmadi et al., 2016).

Dessa forma, objetivou-se neste trabalho, o emprego do extrato enzimático bruto contendo atividade de lipase (obtido da lavagem do farelo de cacau previamente fermentado pelo fungo *Penicillium roqueforti*) na esterificação do ácido oleico e a otimização das condições (tempo e temperatura) desta reação por meio da metodologia de planejamento experimental. Dessa forma, a lipase obtida por um processo mais

simples (FES e extrato não purificado) do que os convencionais (reagentes sintéticos e diversas etapas de purificação), pôde ser avaliada quanto a sua capacidade catalítica e potencial aplicação industrial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Enzima

Com base em trabalho anterior , o *Penicillium roqueforti* foi cultivado em 10 g de farelo de cacau seco (com atividade de água inicial ajustada para $a_w = 0.886$) por 60 h a temperatura constante de 26.75°C em estufa do tipo (SL 222, Solab, Piracicaba, Brasil); foram empregados na inoculação 10^7 esporos por g de substrato seco. O farelo de cacau foi obtido de produtores de chocolate locais da região de Ilhéus (Bahia, Brasil) e foi seco a 50°C por 24h e peneirado de forma a apresentar um tamanho médio de partícula de 2 mm. Após a fermentação, o substrato fermentado foi lavado com tampão Fosfato de sódio (0,1 M pH 7), o líquido coletado (livre de células e esporos) foi empregado neste estudo como extrato enzimático e apresentou uma atividade de lipase inicial de 48,64 U/g . O extrato enzimático foi acondicionado a 4°C até seu uso, não ultrapassando o período de estoque de sete dias.

2.2 Substratos e solventes

As reações para a medida da atividade de esterificação da lipase ocorreu com o substrato ácido oleico, padrão analítico, e álcool metílico (99,8% de pureza) ambos adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro - RJ).

2.3 Reação de esterificação

Para as reações de esterificação do ácido oleico a oleato de metila foram empregados ácido oleico (padrão analítico, CAS número: 112-80-1) e álcool metílico (99,8% de pureza, CAS número: 67-56-1), ambos adquiridos da Vetec[®] (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As reações foram realizadas em tubos cilíndricos (10 cm x 3 cm) com rosca, selados com Parafilm M[®] (Bemis NA). A reação foi composta pela relação de álcool metílico:ácido; oléico:extrato; enzimático (0,034mol:0,0531mol:1g) como sendo (6:1:1), considerando-se 4 g de mistura total reativa. Os frascos foram incubados em

diferentes condições de tempo e temperatura, em banho de óleo, sob agitação de 100 rpm. Após o tempo de incubação, a solução foi decantada em funil e lavada lentamente com 20 mL de uma solução de partes iguais de éter e água. Das fases formadas, a inferior foi descartada e a superior foi deixada sob agitação suave para evaporação do solvente em temperatura ambiente. Desta fase, foram coletadas alíquotas para determinação da conversão da reação de esterificação.

2.4 Análise de conversão

Da fase final obtida após a esterificação, foram retiradas 3 alíquotas de 1g e dissolvidas em 20 mL de éter:álcool etílico (1:1) com 3 gotas do indicador fenolftaleína a 0.1 (g/100mL) e tituladas com NaOH (0.1 M). O volume de base consumida (V_{NaOH} , mL) assim como sua concentração (C_{NaOH} , M), a massa molar do ácido oleico ($MM_{oleic} = 282.46$ g/mol) e o peso da amostra (m_{sample} , g) foram empregado na determinação da porcentagem de conversão da esterificação (Y , %) , conforme a Equação 1. A análise foi realizada em triplicata.

$$Y (\%) = 100 - \left[\frac{(C_{NaOH})(V_{NaOH})(MM_{oleic})}{10^3(m_{sample})} \right] \text{ Equação 1}$$

2.5 Otimização da reação de esterificação

A otimização das variáveis independentes (fatores): tempo de reação (t) de 75 a 210 min e temperatura (T) de 17 a 37°C, das reações de esterificação foram analisadas por meio da metodologia de planejamento experimental, com uma matriz de Doehlert contendo 3 pontos centrais e 6 experimentos em diferentes níveis (Tabela 1) (SENA, *et al.* 2012; Rodrigues & Iemma, 2014). A variável dependente (resposta) analisada foi a conversão (Y , %) da reação de esterificação. O software utilizado para análise estatística dos dados e obtenção da superfície de resposta e curva de contorno foi o programa STATISTICA[®] 10 (StatSoft, USA).

Tabela 1: Matriz do planejamento Doehlert com seus níveis reais e codificados (em parênteses) das variáveis independentes avaliação da temperatura (°C) e tempo de

agitação (min), para a otimização da reação de esterificação do ácido oleico e lipase produzida por fermentação sólida do farelo de cacau e *Penicillium roqueforti*.

Experimentos	Variáveis	
	Tempo de agitação (min)	Temperatura (°C)
1	120 (0)	27 (0)
2	120 (0)	27 (0)
3	120 (0)	27 (0)
4	210 (1)	27 (0)
5	165 (0,5)	37 (0,866)
6	30 (-1)	27 (0)
7	75 (-0,5)	17 (-0,866)
8	165 (0,5)	17 (-0,866)
9	75 (-0,5)	37 (0,866)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A lipase de *Penicillium roqueforti*, cultivado em farelo de cacau, teve algumas de suas características analisadas em trabalho anterior (dados não publicados), sendo suas condições ótimas de temperatura e pH, respectivamente, 33,8°C e 6,8. De acordo com os resultados obtidos, as maiores conversões (Y , %), ocorreram nos pontos centrais e no experimento 4 (Tabela 2), todos conduzidos a $T = 27^{\circ}\text{C}$ e com conversão média de $49.5 \pm 14.5\%$. Já com relação ao tempo de reação (t , min), as maiores conversões foram obtidas com a condição central (120 min), resultando num valor médio de conversão de $56.1 \pm 7.4\%$.

Tabela 2: Matriz do planejamento Doehlert com seus níveis reais e codificados (em parênteses) das variáveis independentes, avaliação da temperatura (°C) e tempo de agitação (min), e variável resposta, conversão (%), para a otimização da reação de esterificação do ácido oleico e lipase produzida por fermentação sólida do farelo de cacau e *Penicillium roqueforti*.

Experimentos	Variáveis		
	Tempo de agitação (min)	Temperatura (°C)	Conversão (%)
1	120 (0)	27 (0)	63,9
2	120 (0)	27 (0)	55,2
3	120 (0)	27 (0)	49,1
4	210 (1)	27 (0)	29,8
5	165 (0,5)	37 (0,866)	0
6	30 (-1)	27 (0)	8,3
7	75 (-0,5)	17 (-0,866)	12,1
8	165 (0,5)	17 (-0,866)	5,3
9	75 (-0,5)	37 (0,866)	1,8

A análise do Pareto (Figura 2) dos dados revelou que, a 95% de significância, apenas os termos quadráticos referentes ao tempo (t2) e da temperatura (T2) foram estatisticamente significativo ($p < 0.05$) para a conversão (Y, %). Assim, removendo-se os termos não significativos para o erro, a análise da variância (ANOVA) (Tabela 3) demonstrou que o modelo obtido (Equação 2) é estatisticamente significativo ($p < 0.05$) e teve bons valores (> 0.90) de coeficientes de regressão (R^2) e de regressão ajustada (R_{adj}^2), apesar de que a falta de ajuste e o erro do modelo sofrem influência ($p > 0.05$) do número reduzido de termos.

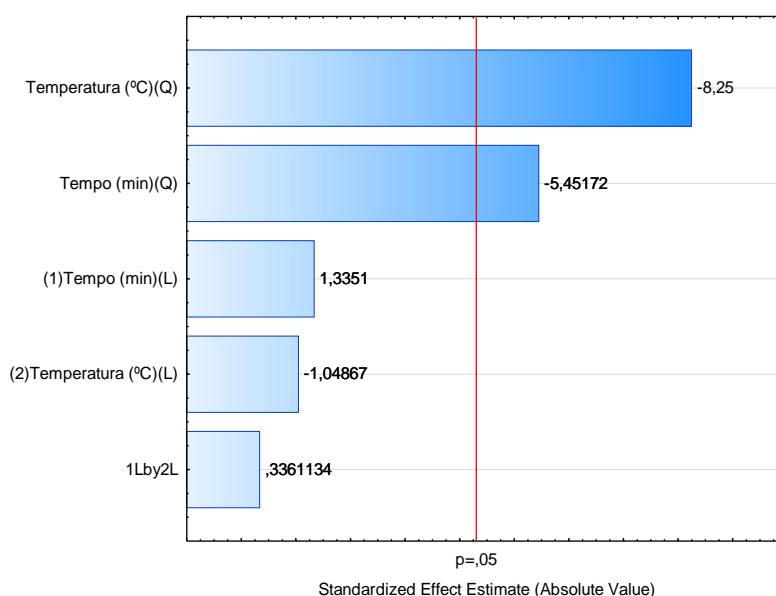


Figura 2: Diagrama de Pareto, para a temperatura (TP) e tempo (T) para a reação de esterificação do ácido oleico, utilizando lipase produzida por fermentação em estado sólido do farelo de cacau, com o fungo *Penicillium roqueforti*. Os dados foram obtidos com o software Statistica® 10.

Tabela 3: Análise de variância (ANOVA) pela Matriz do planejamento Doehlert, em 95% de intervalo de confiança.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado	P
Regressão	4764,05	5	952,8108	10,924	9,01	0,005
Resíduo	261,65	3	87,21611			
Falta de ajuste	151,002	1	151,0017			0,768
Purro erro	110,647	2	55,32333			
SQ total	5025,702	8				
R²	0,9479					

GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; R2 = Coeficiente de Determinação; P= Nível de probabilidade.

$$\text{Convers\~{a}o (\%)} = 56,066 - 9,254 TP^2 - 42,012T^2 \text{ (Equa\~{c}\~{a}o 3)}$$

Onde:

TP: Temperatura

T: Tempo

A partir do modelo (Equa\~{c}\~{a}o 3), foi poss\xedvel conduzir a an\xe1lise das superf\xedcies de resposta e curva de contorno, apresentadas na Figura 3, de acordo com estes dados, a regi\~{a}o de \xf3timo para a convers\~{a}o (Y, %), encontra-se em torno das condi\~{c}\~{o}es de 24 – 30°C e 100 – 160 min, o que equivale, mais especificamente, \xe0 condi\~{c}\~{o}es dos pontos centrais (27°C e 120 min) que resultaram (Tab. 1) em uma convers\~{a}o m\xodia de 56.07 ± 7.44 %. J\xe1 o modelo obtido (Eq. 3), forneceu as mesmas condi\~{c}\~{o}es te\xf3ricas otimizadas e o mesmo valor de convers\~{a}o te\xf3rico otimizado, n\~{a}o apresentando neste caso, desvio em rela\~{c}\~{a}o ao valor experimental (apesar da variabilidade entre as replicatas), o que valida o modelo proposto. Assim, sob as condi\~{c}\~{o}es avaliadas, convers\~{o}es te\xf3ricas acima de 50% podem ser obtidas numa faixa bem estreita de temperatura 26.35 – 27.65°C e em tempos de 85.8 – 154.2 min.

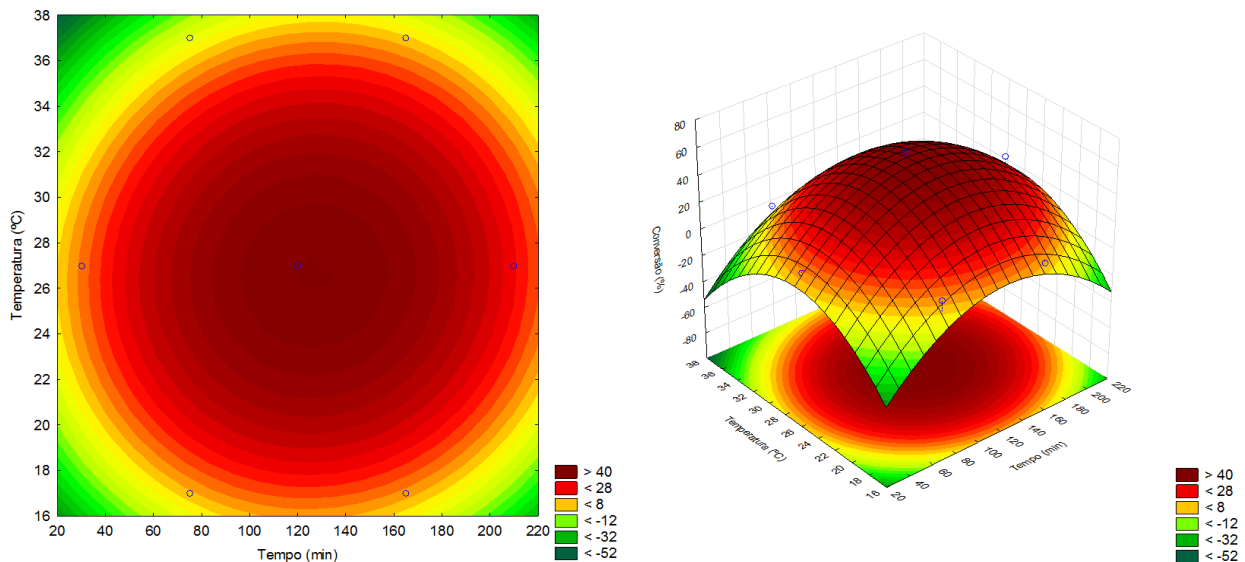


Figura 3: Superf\xedcie de contorno e de resposta para a rea\~{c}\~{a}o de esterifica\~{c}\~{a}o do \xe1cido oleico, utilizando lipase produzida por fermenta\~{c}\~{a}o em estado s\xf3lido do farelo de cacau, com o fungo *Penicillium roqueforti*, de acordo com o n\xedveis codificados de temperatura (TP) e tempo (T) fixado no n\xedvel 0. Os dados foram obtidos com Statistica® 10.

livre e metanol. Em outro estudo, Oliveira et al. (2015) avaliaram o emprego direto do

substrato fermentado (sementes de girassol) seco (30°C/48 h), contendo uma atividade de lipase de 60 U, em reações de esterificação (30°C/180 rpm) sob a razão molar de 1:9 de ácido oleico e metanol, em presença de n-hexano; neste caso foram obtidas conversões de 70% pela lipase de *P. sumatrense*, após 12h, e 90% com a lipase de *A. fumigatus*, após 8 h. Estas conversões foram superiores às apresentadas, para a lipase de *P. roqueforti*, entretanto, neste presente trabalho foi empregada uma temperatura mais amena (27°C), o extrato enzimático não foi purificado (o que reduz o custo do processo e ainda assim resulta em mais de 50% de conversão), não se faz necessária uma etapa de recuperação da enzima após a esterificação, e nenhum solvente foi empregado (o que facilita as etapas do processo).

4 CONCLUSÃO

O processo avaliado neste presente trabalho envolve a aplicação de uma lipase, proveniente do cultivo de *Penicillium roqueforti* - um microrganismo com classificação GRAS (Generally Recognized as Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration, USA) - em um substrato alternativo (farelo de cacau), em reações de esterificação para obtenção de oleato de metila. A enzima obtida pelo processo alternativo foi empregada sem nenhuma etapa de purificação e demonstrou bom desempenho reacional, tanto quanto as lipases em outros sistemas mencionados na literatura, e apresenta bom potencial biotecnológico.

5 REFERÊNCIAS

- BAJAJ A, Lohan P, JHA PN, MEHROTRA R (2010) Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **J Mol Catat B:Enzym** 62:9-14.
- BENSALAH, W. et al. Thick and Dense Anodic Oxide Layers Formed on Aluminum in Sulphuric Acid Bath. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 113-118, 2010.
- Fjerbaek, L.; Christensen, K.V.; Norddahl, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298-1315, 2009.
- Fleuri, L. F.; Sato, H. H. β -1,3-glucanases e quitinasas: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1224-1231, 2008.
- Franken LPG, Marcon NS, Treichel H, Oliveira D, Freire, DMG, Dariva C, Destain J, Oliveira JV (2010) Effect of treatment with compressed propane on lipases hydrolytic activity. **Food Bioprocess Technol** 3: 511-520
- Freire, GDM e Castilho, FL, lipases em Biocatálise. In: Bon et al. (org). Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado. Rio de Janeiro, **Interciência** (2008).
- Gandhi, N.N., Applications of lipases V. 74, p. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, 621-634 , 1997
- Gomes, F. M.; Paula, A. V.; Silva, G. S.; de Castro, H. F.; Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada carbonildiimidazol. **Quimica Nova**. 2006, 29, 710
- Gulati, R.I.J., V. Kumar, A.K. Parsad, V.S. Parmar and R.K.Saxena. 2005. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using Neem oil, and its applications. **Pure and Applied Chemistry**, 77: 251-262.
- Li, J., Li, L., Tong, J., Wang, Y., Chen, S., 2012. Research development on lipase-catalyzed biodiesel. **Energ. Procedia**. 16, 1014– 1021.

Linfield, WM; Barauskas, RA; Sivieri, G .; Serota, S. e Stevenson Sr., RW, enzimática gordo de síntese e hidrólise, **Journal of the American Oil Chemistry Society**, 61, 191 (1984).

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

Nelson, David L.; Cox, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Oliveira, A.C.D., Watanabe, F.M.F., Vargas, J.V.C., Rodrigues, M.L.F., Mariano, A.B., **Produção de oleato de metila catalisado por sólido fermentado contendo lipases fúngicas**. XX Simpósio nacional de bioprocessos , XI Simpósio de hidrólise enzimática de biomassa. Fortaleza, Ceará, Brasil. 2015.

Santos, R. R. et al. Characterization of different oil soapstocks and their application in the lipase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, p. 561-566, 2014.

Sena, A.R., Valasques, G.L.J., Barreto, I.K. Assis, S.A., Application of Doehlert experimental design in the optimization of experimental variables for the *Pseudozyma* sp. (CCMB 306) and *Pseudozyma* sp. (CCMB 300) cell lysis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 32(4): 762-767, out.-dez. 2012

Takaya T, Koda R, Adachi D, Nakashima K, J Wada, Bogaki T, Ogino C, Kondo A. Produção de biodiesel altamente eficiente por um biocatalisador de célula inteira empregando um sistema com alta expressão de lipase em *Aspergillus oryzae* . **Appl Microbiol Biotechnol**. 2011 ; 90 : 1171-1177.

Zhong, H, Zheng , F., Zoub, B., Li, X. , Ouyanga,P., Guoa,K., Studies on the lipase-catalyzed esterification of alkyl oleates in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 90 (2013) 114–117.

Yin, C.; Liu, T.; Tan, T. Synthesis of vitamin A esters by immobilized *Candida* sp. Lipase in organic media. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 1, p. 81-86, 2006.