

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE
PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

JESSICA TOMBINI

**PRODUÇÃO DE LIPASE FÚNGICA A PARTIR DE SUBPRODUTOS
DO PROCESSAMENTO DE SOJA**

DISSERTAÇÃO

Pato Branco

2015

JESSICA TOMBINI

**PRODUÇÃO DE LIPASE FÚNGICA A PARTIR DE SUBPRODUTOS
DO PROCESSAMENTO DE SOJA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de "Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos" – Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha.

Coorientador: Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima

PATO BRANCO

2015



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos



TERMO DE APROVAÇÃO Nº 28

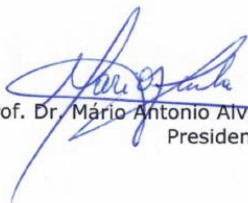
Título da Dissertação

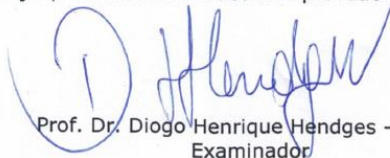
**"PRODUÇÃO DE LIPASE FÚNGICA A PARTIR DE SUBPRODUTOS DO
PROCESSAMENTO DE SOJA"**

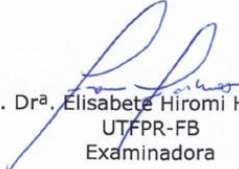
Autora

JESSICA TOMBINI

Esta dissertação foi apresentada às 9 horas do dia 29 de maio de 2015, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em Biotecnologia – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado


Prof. Dr. Mário Antonio Alves da Cunha - UTFPR
Presidente


Prof. Dr. Diogo Henrique Hendges - UTFPR
Examinador


Prof.ª Dr.ª Elisabete Hiromi Hashimoto -
UTFPR-FB
Examinadora

Visto da Coordenação


Prof.ª Dra. Raquel Dalla Costa da Rocha
Coordenadora do PPGTP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é luz em meu caminho e força fundamental em meu ser.

À minha família amada. Em especial aos meus pais Adonar e Ângela, peças chave na minha formação, sempre dispondo de muito amor, confiança e apoio mútuo. A minha querida irmã Maria Luisa, pelas conversas e palavras de amor.

Ao meu amado namorado André, que se fez presente desde a época de ensino médio, passando pelos anos de graduação e mestrado, sempre me apoiando e ajudando. Obrigada pela paciência amor incondicional.

Ao meu orientador Prof. Mário, pela confiança em mim depositada para a execução deste projeto, pelos seus conhecimentos repassados, pela paciência e dedicação no processo de construção do trabalho e pela disponibilidade em todos os momentos necessários.

Ao meu coorientador Prof. Vanderlei Aparecido de Lima por toda ajuda e paciência a mim destinada.

À professora Adriana Knob, por sua grande contribuição e esclarecimentos pertinentes ao trabalho.

Aos amigos e companheiros de laboratório, Thaís, Michelli e Michel, que contribuíram para construção do trabalho, seja trabalhando ao meu lado ou mesmo com as conversas de apoio.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida durante os anos de mestrado.

RESUMO

TOMBINI, Jessica. Seleção de microrganismos lipolíticos e produção de lipase a partir de subprodutos do processamento de soja. 2015. 73 f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

As lipases microbianas têm destaque comercial por apresentarem elevada especificidade e estabilidade em suas reações, permitindo assim, que a indústria de lipases seja composta por diversos segmentos, englobando a indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil, tratamento de efluentes e reutilização de resíduos agrícolas. No presente estudo os subprodutos farelo de soja e *okara* foram avaliados quanto aos aspectos físico-químicos e morfológicos e tais características sugerem seu uso potencial como substrato em fermentações sólidas para a produção de lipase extracelular. Buscando a produção de enzimas lipolíticas a partir destes substratos, foram avaliadas quatro cepas selvagens de fungos filamentosos através de fermentações no estado sólido. O farelo de soja foi a biomassa que demonstrou maior potencial como substrato para a produção de lipase sem suplementação nutricional do meio. O isolado fúngico S4 (*Penicillium sp*) apresentou o maior potencial lipolítico entre os fungos avaliados. Um delineamento composto central rotacional 2^3 demonstrou que os parâmetros de cultivo concentração de conídios e umidade são variáveis que influenciam a produção da enzima pelo fungo. O tempo de cultivo não demonstrou ter efeito significativo sobre a produção da lipase e maior produção de lipase ($73,85 \text{ U.L}^{-1}$) foi obtida quando usando inóculo na concentração de 10^5 esporos / mL e meio de cultivo com umidade de 54%. A lipase bruta demonstrou condições ótimas de atividade a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ em pH 8,0 e foi ativa na faixa de pH entre 6 e 11. Apresentou atividade relativa superior a 50% entre as temperaturas $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (30 minutos de aquecimento) e manteve 50 % de sua atividade quando aquecida a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 minutos. Os íons Ca^{2+} , K^+ , Cu^{2+} (2 mM) e I^- apresentaram efeito ativador sobre a atividade lipolítica da enzima, diferentemente do íon Fe^{2+} , que apresentou forte inibição. A enzima bruta foi sensível à presença dos solventes orgânicos acetona, DMSO, metanol e propanol e foi ativada pelo solvente hexano.

Palavras chave: Enzimas lipolíticas, *okara*, farelo de soja, fermentação sólida.

ABSTRACT

TOMBINI, Jessica. Selection of lipolytic microorganisms and lipase production from soy processing byproducts. 2015. 73p. Master Thesis in Technology of Chemical and Biochemical Process – Technological Federal University of Paraná. Pato Branco, 2015.

Microbial lipases gain great commercial prominence because they have high specificity and stability in their reactions, allowing the lipase industry to be composed of several segments, such as food, pharmaceutical, textile, wastewater treatment and reuse of agricultural waste. Seeking for the production of lipolytic enzymes from these substrates, four wild strains of filamentous fungi was assessed by solid state fermentations. The soybean meal biomass showed higher potential as substrate for lipase production without nutritional supplementation of medium. The fungal isolated S4 (*Penicillium sp*) had the highest lipolytic potential among the evaluated fungi. A rotational central composite design 2^3 demonstrated that culture parameters spore concentration and moisture are variables that affect enzyme production by the fungus. The cultivation time demonstrated no significant effect on lipase production and increased production of lipase ($73,85 \text{ UL}^{-1}$) was obtained when using inoculum at a concentration of 10^5 spores / mL and culture medium with 54% moisture. Crude lipase showed optimum conditions of activity at 35°C at pH 8.0 and it was active in the pH range between 6 and 11. Enzymatic extract showed relative activity of 50% among the temperature of 20°C and 40°C (30 minutes of heating) and kept 50% of its activity when heated at 40°C for 60 minutes. The ions Ca^{2+} , K^+ , Cu^{2+} (2 mM) and I^- showed activating effect on the lipolytic activity of the enzyme, unlike ion Fe^{2+} , which showed strong inhibition. The crude enzyme was sensitive to the presence of organic solvents as acetone, DMSO, methanol, propanol and the enzyme was activated by the hexane solvent.

Keywords: Lipolytic enzymes, *okara*, soybean meal, solid fermentation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Modelo de complementaridade estrutural entre substrato e enzima (modelo encaixe induzido) | 14 |
| Figura 2 - Representação esquemática das reações de hidrólise, esterificação e interesterificação catalisadas por lipases. | 18 |
| Figura 3 - Fluxograma das combinações entre os substratos e fungos selecionados | 31 |
| Figura 4 - Cultivo em meio sólido | 34 |
| Figura 5 - Farelo de soja (A); <i>Okara</i> desidratado (B) | 38 |
| Figura 6 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura: farelo de soja com ampliação de 600x (A) e ampliação de 2000x (C); <i>okara</i> com ampliação de 600x (B) e ampliação de 2000x (D)..... | 41 |
| Figura 7 - Espectro de infravermelho do substrato <i>okara</i> | 42 |
| Figura 8 - Espectro de infravermelho do substrato farelo de soja | 43 |
| Figura 9 - Superfície de resposta e gráfico de contorno referente à atividade de lipase do isolado fúngico S4..... | 51 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 - Atividade lipolítica ($U.L^{-1}$) observada na fermentação no estado sólido .. | 45 |
| Gráfico 2 - Efeitos estimados da umidade (U), concentração de conídios (CC) e tempo de cultivo (T) sobre atividade lipolítica. U (L), [CC] (L) e T(L): efeito linear; U (Q), [CC] (Q) e T(Q): efeito quadrático; [CC]xT, UxT e [CC]xU: interação entre dois fatores. | 50 |
| Gráfico 3 - Efeito da temperatura sobre a atividade lipolítica | 53 |
| Gráfico 4 - Estabilidade da enzima frente a temperatura | 54 |
| Gráfico 5 - Efeito do pH sobre a atividade lipolítica..... | 56 |
| Gráfico 6 - Estabilidade da enzima frente ao pH..... | 57 |
| Gráfico 7 - Representação gráfica dos efeitos dos íons metálicos sobre a atividade lipolítica. Os números após cada elemento indicam a concentração molar da solução de íons (mM). | 59 |
| Gráfico 8 – Representação gráfica do efeito de solventes orgânicos sobre a atividade lipolítica. Os números em cada solvente representam a concentração (% v/v) do solvente no meio. | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Delineamento composto central rotacional - 2 ³ utilizando farelo de soja como substrato..... | 32 |
| Tabela 2 - Matriz do delineamento composto central rotacional 2 ³ utilizando farelo de soja como substrato | 32 |
| Tabela 3 - Composição proximal das amostras de farinha de farelo de soja e <i>okara</i> | 38 |
| Tabela 4 - Resultados de atividade lipolítica | 44 |
| Tabela 5 - Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para avaliação da influencia das variáveis concentração de esporos (CC), umidade (U) e tempo (T) sobre a atividade lipolítica pelo isolado S4 (<i>Penicillium sp.</i>) | 47 |
| Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) e coeficientes de regressão dos dados do planejamento DCCR 2 ³ | 48 |
| Tabela 7 - Efeito de diferentes íons na atividade lipolítica | 58 |
| Tabela 8 - Efeito de diferentes solventes orgânicos sobre a atividade lipolítica..... | 60 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 OBJETIVOS | 11 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 12 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 12 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 13 |
| 3.1 ENZIMAS | 13 |
| 3.2 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO | 16 |
| 3.3 LIPASES | 17 |
| 3.4 APLICAÇÕES DAS LIPASES | 20 |
| 3.5 FARELO DE SOJA | 22 |
| 3.6 OKARA | 24 |
| 4 METODOLOGIA | 26 |
| 4.1 FUNGOS | 26 |
| 4.2 OKARA | 26 |
| 4.3 FARELO DE SOJA | 27 |
| 4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS BIOMASSAS FARELO DE SOJA E OKARA ORIUNDOS DO PROCESSAMENTO DE SOJA | 27 |
| 4.4.1 Teor de umidade | 27 |
| 4.4.2 Resíduo mineral fixo | 27 |
| 4.4.3 Lipídeos | 28 |
| 4.4.4 Proteínas | 28 |
| 4.4.5 Fibra bruta | 29 |
| 4.4.6 Atividade de água | 29 |
| 4.4.7 Obtenção das farinhas de <i>okara</i> e farelo de soja | 29 |
| 4.4.8 Caracterização das farinhas de <i>okara</i> e farelo de soja por microscopia de varredura eletrônica | 30 |
| 4.4.9 Caracterização das farinhas de <i>okara</i> e farelo de soja por Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) | 30 |
| 4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LIPOLÍTICO DOS FUNGOS ISOLADOS | 31 |
| 4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE EM FERMENTAÇÃO SÓLIDA USANDO FARELO DE SOJA COMO SUBSTRATO | 32 |
| 4.7 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS ORIUNDO DAS FERMENTAÇÕES SÓLIDAS | 34 |
| 4.8 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXTRATO BRUTO | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 4.8.1. Determinação de pH e temperatura ótimos..... | 35 |
| 4.8.2 Estabilidade enzimática (lipase) em diferentes temperaturas e pH..... | 35 |
| 4.8.3 Efeito de íons metálicos sobre a atividade lipolítica | 35 |
| 4.8.4 Efeito de solventes orgânicos sobre atividade lipolítica | 36 |
| 4.9 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA | 36 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 38 |
| 5.1 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS BIOMASSAS FARELO DE SOJA E OKARA . | 38 |
| 5.1.1 Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das biomassas <i>okara</i> e farelo de soja..... | 41 |
| 5.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)..... | 42 |
| 5.3 POTENCIAL LIPOLÍTICO DOS FUNGOS ISOLADOS | 44 |
| 5.4 DEFINIÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES PARA PRODUÇÃO DE LIPASE USANDO O FARELO DE SOJA COMO SUBSTRATO..... | 47 |
| 5.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXTRATO ENZIMÁTICO..... | 53 |
| 5.5.1 Efeito da temperatura e estabilidade da enzima | 53 |
| 5.5.2 Efeito do pH e estabilidade da enzima em diferentes valores de pH | 55 |
| 5.5.3 Estabilidade frente a íons metálicos | 58 |
| 5.5.4 Estabilidade frente a solventes orgânicos | 60 |
| 6 CONCLUSÃO | 63 |
| REFERÊNCIAS..... | 64 |

1 INTRODUÇÃO

As lipases, classificadas como triacilglicerol-acil hidrolases (EC 3.1.1.3), desempenham um papel chave em relação ao metabolismo de lipídeos, pois são capazes de provocar hidrólise completa ou parcial dos mesmos, podendo também, em condições específicas, promover reações de síntese. Tais enzimas lipolíticas ganham grande destaque na literatura científica por apresentarem elevada especificidade e estabilidade em suas reações, permitindo assim, que a indústria de lipases seja composta por diversos segmentos, englobando a indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil, tratamento de efluentes e reutilização de resíduos agrícolas (VAZ; CHOUPINA, 2012, CARVALHO et al., 2003).

No processamento da semente de soja para obtenção dos mais variados produtos, podem ser listados dois subprodutos que apresentam características atraentes para produção enzimática: o farelo de soja e o *okara*. O farelo de soja é obtido da prensagem da semente de soja, já o *okara*, é o subproduto originado da produção do extrato hidrossolúvel de soja. Tais biomassas apresentam elevado conteúdo de lipídeos e apresentam potencial como matéria prima para a produção microbiana de lipases, podendo ser aplicados em fermentações submersas ou sólidas empregando bactérias, leveduras ou fungos filamentosos.

Considerando o Brasil um grande gerador de resíduos e subprodutos agrícolas e agroindustriais, uma alternativa do aproveitamento destes é implementá-los no processamento tecnológico de produtos derivados, ou ainda, utilizá-los como substrato na obtenção de produtos de relevância biotecnológica. Neste contexto, foi proposto neste trabalho, a seleção de microrganismos com potencial lipolítico; o estudo do potencial de aproveitamento de subprodutos (*okara* e farelo de soja) do processamento de soja para produção de lipases microbianas extracelulares.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a produção de lipases a partir de fungos filamentosos e avaliar subprodutos agroindustriais como substratos para fermentação no estado sólido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar fungos filamentosos com potencial para produção de lipases.
- Caracterizar os parâmetros físico-químicos dos subprodutos *okara* e farelo de soja: umidade, teores de lipídeo, proteína, resíduo mineral, fibra bruta e atividade de água.
- Obter farinhas dos subprodutos e caracterizá-las quanto aos aspectos morfológicos através de microscopia eletrônica de varredura e obter espectros de infravermelho.
- Avaliar os subprodutos *okara* e farelo de soja como substratos para produção de lipase extracelular.
- Avaliar os parâmetros concentração de conídios, umidade do meio e tempo de cultivo sobre a produção de lipase em fermentação sólida dos subprodutos empregando metodologia de planejamento fatorial.
- Caracterizar parâmetros bioquímicos dos extratos enzimáticos bruto (pH e temperatura ótima, estabilidade quanto ao pH e temperatura de incubação, efeitos de íons e solventes orgânicos na atividade hidrolítica).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ENZIMAS

O uso de enzimas na produção de bens para o consumo humano é conhecido há pelo menos 2.000 anos, quando os microrganismos passaram a ser utilizados em alguns processos, tais como na fabricação de pão e na sacarificação do arroz para produção de *Koji*. O mecanismo reacional envolvendo as enzimas era desconhecido até 1877, quando Moritz Traube propôs que ‘materiais semelhantes às proteínas catalisavam a fermentação, entre outras reações químicas’. A palavra *zymase* foi, então, usada para descrever um extrato livre de células, sendo este o reconhecimento inicial do que é denominado atualmente de enzima (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013).

Para que ocorra a exata diferenciação de todas as enzimas, a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) desenvolveu um sistema de numeração conhecido como “E.C.” (*Enzyme Commission of the IUBMB*). O sistema é composto por quatro números para cada enzima e no total existem seis divisões em que as mesmas podem ser classificadas, de acordo com o tipo de catálise que realizam. Por exemplo, o primeiro dos quatro números (1-óxido-redutase, 2-transferases, 3-hidrolases, 4-liases, 5-isomerases, 6-ligases) é referente à classe, o segundo à sub-classe, o terceiro à grupos químicos específicos que participam da reação e o quarto a enzima propriamente dita (DEVLIN, 2011).

A maioria das enzimas são proteínas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas (COX; NELSON, 2011). Enzimas podem ser classificadas como proteínas capazes de catalisar reações biológicas, considerando que quase todas as reações que se procedem no interior das células requerem a ação de uma enzima. As enzimas são necessárias, pelo fato, de que sem elas, a reação não ocorreria em velocidade detectável nas condições fisiológicas da célula. Basicamente, a ação da enzima provoca o aumento da taxa de conversão de um determinado substrato em um produto (DEVLIN, 2011).

A função das enzimas é diminuir a energia de ativação da reação, aumentando assim a sua velocidade. A ação das enzimas promove o aumento da velocidade da reação por um fator de até 10^{20} vezes a mais que reações não catalisadas. O equilíbrio da reação não é afetado pela enzima. E, para que ocorra a catálise, é necessário ter a enzima ligada a um substrato, e essa reação se procede no chamado sítio ativo, sendo este uma pequena porção da enzima, localizado em uma fenda na superfície da proteína. O substrato é conhecido como a molécula que se liga ao sítio ativo, sofrendo a ação da enzima. Comumente, o sítio ativo engloba o substrato, retirando-o completamente da solução (CAMPBELL, 2007; COX; NELSON, 2011).

Uma das principais características das enzimas consiste na sua alta especificidade, uma vez que os substratos e as enzimas são complementares geometricamente, e isso pode ser representado por um modelo chamado de “chave-fechadura” conforme ilustra a Figura 1 (MONTEIRO; SILVA, 2009). Basicamente, o processo de catálise ocorre com a adsorção de uma enzima solúvel em água (E) na interface lipídeo-água que conduz a um estado de energia mais favorável à enzima (E^*). A enzima presente na interface passa a se ligar a uma molécula de substrato (S), que resulta na formação de um complexo enzima - substrato (E^*S). Após dois processos catalíticos dimensionais o produto (P) é gerado e solubilizado na fase aquosa (REIS et al., 2009).

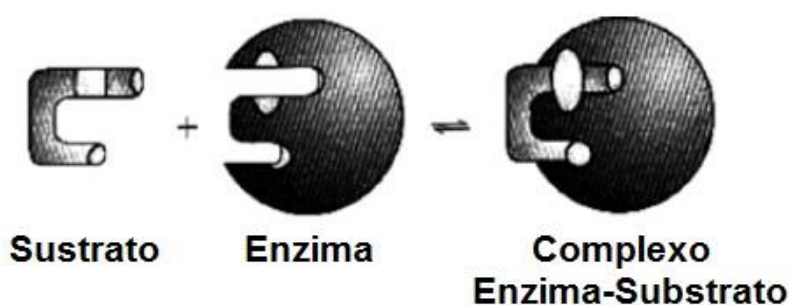


Figura 1. Modelo de complementaridade estrutural entre substrato e enzima (modelo encaixe induzido)

Fonte: Monteiro; Silva (2009)

Algumas desvantagens são observadas no uso de enzimas nos processos industriais, dentre elas estão a sensibilidade das enzimas frente a variações de pH e temperatura. O efeito do pH se dá devido ao fato de que as enzimas são formadas

por grupos químicos, na sua maioria aminoácidos, que podem sofrer ionizações e passam a ter cargas momentâneas promovendo uma mudança estrutural conformacional, afetando o modelo “chave-fechadura”. A temperatura influencia no sentido de aumentar a energia cinética das moléculas e conseqüentemente aumentar a possibilidade de encontro entre a enzima e o substrato. Entretanto, altas temperaturas provocam rompimento de ligações e interações, levando a um processo denominado desnaturação enzimática que neste caso, pelo efeito da temperatura, se torna um processo irreversível (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Algumas enzimas requerem outros componentes adicionais para realizar a catálise, os cofatores são um dos exemplos, sendo íons inorgânicos como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} . Outros exemplos, são as chamadas coenzimas, agindo como carreadores transitórios de grupos funcionais específicos que consistem em moléculas orgânicas ou metalorgânicas complexas (NELSON; COX, 2011).

Ao proceder à catálise, a enzima também pode ser inibida por algumas substâncias que se ligam à enzima livre ou ao complexo enzima - substrato. Os inibidores podem competir pelo sítio catalítico da enzima, resultando na diminuição ou eliminação da atividade enzimática. A inibição pode ser do tipo competitiva, onde o inibidor se liga à enzima livre impedindo a ligação da enzima com o substrato. Também, a inibição pode ser do tipo incompetitiva, onde o inibidor não se liga a enzima no estado livre, e sim ao complexo enzima - substrato tornando-o inativo (MONTEIRO; SILVA, 2009).

De acordo com Jegannathan, (2013) as enzimas são facilmente biodegradáveis e geralmente levam a reduzida ou nenhuma toxicidade. Estas propriedades permitem que os fabricantes produzam os mesmos produtos, sendo até de melhor qualidade, com menor quantidade de matéria-prima, produtos químicos, água, consumo de energia e menor geração de resíduos comparado aos processos convencionais não enzimáticos.

As enzimas para o uso industrial são produzidas por bactérias e fungos em fermentação no estado sólido (FES) ou submerso (FS). A FS é o modo de fermentação primária e as operações unitárias na produção de enzimas envolvem primeiramente a própria fermentação, seguido pela adição de células de perturbação e posterior filtração. A enzima bruta é ainda purificada por precipitação seguida de centrifugação e liofilização, conhecidos coletivamente como “processamento *downtream*” (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013).

O mercado das enzimas é dividido em dois grupos principais, as enzimas industriais (de caráter técnico, alimentício e para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para pesquisa). As enzimas de uso industrial ocupam 60% do mercado mundial. Entre as mais utilizadas, se destacam as amilases (25,4%), celulasas (17,1%) e lipases (7,2%). A América representa 3,4% da demanda mundial de enzimas, sendo o Brasil o país mais expressivo deste conjunto, responsável por 60% do consumo de enzimas no continente (MONTEIRO; SILVA, 2009).

3.2 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

A fermentação no estado sólido (FES) é um método de cultura alternativo que vem ganhando atenção dos pesquisadores ao longo dos últimos 20 anos, além de credibilidade entre muitas corporações industriais (BARRIOS, 2012). A FES pode ser definida como o bioprocessamento realizado em quase ausência de água livre. No entanto, o substrato deve possuir umidade suficiente para suportar o crescimento e a atividade metabólica do microrganismo. A matriz sólida pode ser a própria fonte de carbono (com outros nutrientes), ou pode ser um material inerte para suportar o crescimento dos microrganismos (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

A FES se assemelha com o habitat natural dos microrganismos e pode, portanto, ser a melhor alternativa para o crescimento microbiano com a finalidade de produzir produtos com valor agregado (SINGHANIA et al., 2009). Vários estudos são desenvolvidos sobre os sistemas FES onde são empregados subprodutos agrícolas como substratos enzimáticos. Isso faz com que a FES se torne uma técnica interessante para países que apresentem biomassas abundantes, uma vez que podem ser utilizadas como matéria-prima de baixo custo. Os fatores mais importantes que afetam a FES são a natureza do substrato, suas propriedades (tamanho da partícula, capacidade de retenção de água e pré-tratamentos), o microrganismo empregado (tipo do microrganismo, a quantidade de inóculo e período de cultivo), e parâmetros físicos (controle da temperatura e controle da

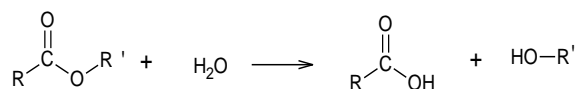
atmosfera gasosa) (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; SINGHANIA et al., 2009; JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

A FES apresenta algumas vantagens em relação à fermentação submersa (FS). Em uma comparação direta entre os dois modos de cultivo, os estudos demonstraram repetidamente que o processo de FES fornece produtividades volumétricas mais elevadas, e é menos propensa a problemas com a inibição pelo substrato, além de produzir enzimas com uma estabilidade de temperatura ou de pH mais elevados. Aspectos ambientais também podem ser ressaltados, pelo fato de que a FES é conduzida na ausência de fase aquosa livre, resultando assim, em um consumo mínimo de água e, portanto, uma baixa produção de efluentes (HÖLKER; LENZ, 2005).

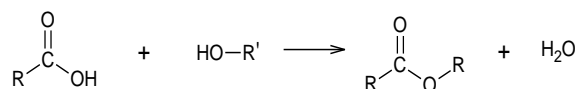
3.3 LIPASES

As lipases verdadeiras (triacilglicerol-acil hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas hidrossolúveis pertencentes à família das serinas hidrolases. Tais enzimas têm como principal função catalisar a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG), liberando diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres. Estas reações de hidrólise são chamadas de normais, ou seja, acontecem no sentido direto da reação (VAZ; SANTA, 2012; CARVALHO et al., 2003). As lipases possuem também a capacidade de catalisar reações de síntese, como de esterificação e interesterificação (transesterificação, alcoólise e acidólise). As reações de síntese são chamadas de anormais, ou de sentido inverso, e um dos fatores decisivos para o equilíbrio da reação no sentido inverso ou direto, é a atividade de água (a_w) do meio (REIS et al., 2009; SAXENA et al., 2003). A Figura 2 indica as possíveis reações catalisadas por lipases.

Reação de Hidrólise

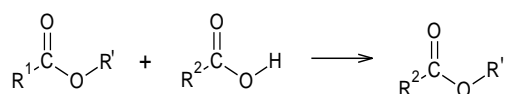


Reação de Esterificação

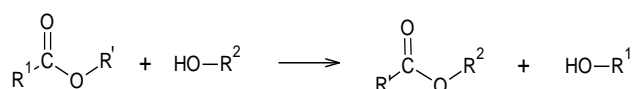


Reação de Interesterificação

Acidólise (Reação de éster com ácido)



Alcoólise (reação de éster com álcool)



Transesterificação (reação de éster com éster)

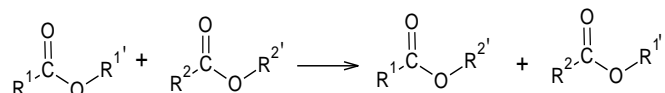


Figura 2. Representação esquemática das reações de hidrólise, esterificação e interesterificação catalisadas por lipases.

Fonte: Carvalho, 2003.

Recentemente, dois critérios tem sido utilizados para classificar uma enzima lipolítica como 'lipase verdadeira', o primeiro, ela deve ser ativada pela presença de uma interface óleo-água, isto é, a sua atividade deverá aumentar significativamente assim que a concentração do substrato for suficientemente alta para formar agregados micelares ou emulsões induzindo a lipase a interagir com a interface dos substratos agregados. Este aumento de atividade é um fenômeno conhecido como ativação interfacial, a qual é responsável pelo aumento na atividade lipolítica em decorrência dos substratos insolúveis. O segundo critério baseia-se no fato de que as lipases devem possuir um sítio ativo coberto por uma cadeia peptídica hidrofóbica

conhecida como “tampa”. Esta tampa, de natureza anfifílica, é composta por aminoácidos polares na parte externa e aminoácidos apolares na parte interna, em contato com o sítio ativo. O contato entre a tampa e uma interface lipídeo-água promove a interação entre ambas, fazendo com que a tampa se mova alterando a forma da enzima (de fechada para aberta) expondo o sítio ativo, permitindo assim a catálise (MESSIAS et al., 2011; ANDALUEMA; GESSESSE, 2012; VAZ; CHOUPINA, 2012).

As lipases agem como catalisadoras em diferentes formas, podendo catalisar células inteiras (lipases mantidas no interior da célula hospedeira); sob a forma livre ou imobilizada, podem catalisar estando em líquidos formulados de lipases (lipases dissolvidas em soluções aquosas); estando imobilizadas, quer por reticulação, encapsulamento, adsorção e/ou encadeamento covalente a uma matriz (STERGIOU et al., 2013). As lipases possuem vários graus de seletividade em relação aos substratos. Elas são capazes de catalisar reações com uma ampla gama de substratos, mas a taxa de reação pode variar amplamente com a estrutura das moléculas (REIS et al., 2009).

Lipases mostram características específicas para sua atividade máxima e estabilidade, a faixa de pH ótimo comumente está entre 6,0 e 8,0 e a temperatura entre 30°C e 40°C. As lipases, geralmente são glicoproteínas ácidas possuindo massa molecular entre 20 e 60 kDa, podendo variar seu ponto isoelétrico entre o pH 4 e 5. Porém, há uma variação significativa nessas propriedades quando se muda a origem da lipase, como por exemplo, entre isoformas produzidas por um mesmo microrganismo (VAZ; CHOUPINA, 2012).

As lipases são amplamente encontradas em plantas, animais e microrganismos. Elas são obtidas tanto por extração a partir de tecido animal ou vegetal, quanto pelo cultivo de microrganismos (KAPOOR; GUPTA, 2012). Das lipases que tem sido isoladas das mais variadas fontes, 45% provém de bactérias, 21% de fungos, 18% de animais, 11% de plantas e 3% de algas (SETH et al., 2014). Um exemplo de lipases isoladas de plantas, pode ser mencionado o trabalho de Santos et al., (2013), onde foram avaliadas as propriedades catalíticas de lipase de sementes de mamona (*Ricinus comuunis*), milho (*Zea mays*), girassol (*Helianthus annuus*) e maracujá (*Passiflora edulis*) visando a aplicação na hidrólise de óleo para a produção de ácidos graxos concentrado. Com relação às lipases isoladas de fontes animais, Mendes et al., (2012) realizaram um estudo de isolamento,

purificação, características estruturais e propriedades bioquímicas de uma lipase isolada de pâncreas suíno.

Os microrganismos com potencial para a produção de lipases podem ser encontrados em diferentes habitats, incluindo resíduos da extração de óleos vegetais, solos contaminados com óleos, sementes e alimentos deteriorados. Isso indica que a natureza oferece um grande leque de possibilidades para a identificação de notáveis fontes de lipases com propriedades inéditas. Como a lipase está entre as classes mais utilizadas de enzimas com aplicações biotecnológicas, a busca é sempre por microrganismos a partir de fontes naturais (SALIHU et al., 2012).

3.4 APLICAÇÕES DAS LIPASES

As lipases se revelam um importante grupo de enzimas, devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, os rendimentos elevados, facilidade de manipulação genética de diferentes microrganismos e à facilidade de produção em grandes quantidades. Devido à elevada especificidade da enzima com o seu substrato, as lipases são amplamente diversificadas em suas propriedades, tornando-se assim muito atrativas para a aplicação industrial (HASAN et al, 2006; ROVEDA et al, 2010).

Lipases constituem o grupo mais notável de catalisadores biológicos que possuem aplicações para biotecnologia, destacando-se também os lucros oriundos de sua produção e comercialização (HASAN et al., 2006). O mercado mundial para as enzimas atingiu sete bilhões dólares em 2013. Sendo que uma grande fração da indústria de enzimas está representada por lipases (SETH et al., 2013).

Na indústria de alimentos as lipases são empregadas na hidrólise da gordura do leite, por exemplo. Em derivados do leite, como no queijo, tais enzimas promovem a maturação e intensificação do sabor. Ainda, as lipases ganham destaque na mudança de características sensoriais nos alimentos, conferindo sabores e aromas diferenciados, sendo esses efeitos provocados pela síntese de

ésteres, ácidos graxos e alcoóis de cadeias curtas (COLLA et al., 2012; VAZ; CHOUPINA, 2012)

As gorduras e óleos são componentes muito importantes dos alimentos, devido seu valor nutricional e sensorial. As propriedades físicas de um triglicerídeo são fortemente influenciadas por fatores tais como posição do ácido graxo no esqueleto do glicerol, o comprimento da cadeia do ácido graxo e seu grau de insaturação. As lipases permitem modificar as propriedades dos lipídeos alterando a localização da cadeia de ácidos graxos no glicerol, podendo também, substituir moléculas de ácidos graxos por outras. Desta forma, um lipídeo menos desejável pode ser trocado por outro de maior valor agregado (SHARMA; CHISTI; CHAND, 2001). Devido seus efeitos metabólicos, os ácidos graxos poli-insaturados (AGPs) são cada vez mais utilizados como produtos farmacêuticos, nutracêuticos e também como aditivos alimentares. Lipases microbianas são utilizadas para obter os AGPs a partir de lipídeos de origem animal e vegetal. Além disso, as lipases são utilizadas para auxiliar a remoção de gordura de produtos de carne e peixe (SHARMA; CHISTI; CHAND, 2001).

O campo de aplicação comercial mais importante para lipases hidrolíticas é a sua adição em detergentes, de uso doméstico e industrial. Por estimativa, aproximadamente 1000 toneladas de lipases são adicionadas em cerca de 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos a cada ano. Entretanto existem três desafios que os produtores de lipases para detergentes precisam atender: (1) a alta variação no teor de triglicerídeos de manchas de gordura, requerendo lipases com baixa especificidade de substrato, (2) a lavagem em condições altas (com valores de pH de 10 a 11 e temperatura de 30 °C a 60°C) exigindo maior estabilidade da enzima, e (3) os efeitos da desnaturação química e degradação proteolítica causada pelos aditivos do detergente, tais como o surfactantes e proteases. Soluções para estes problemas são estudadas analisando as propriedades das lipases pela engenharia de proteínas (JAEERG; REETZ, 1998; COLLA et al., 2012).

No tratamento de despejos industriais, as lipases são utilizadas em todos os processos aeróbicos de resíduos em que camadas finas de gordura devem ser continuamente retiradas da superfície dos tanques para permitir o transporte de oxigênio (necessário na manutenção de vida da biomassa celular). As unidades industriais que mais necessitam do tratamento de efluentes são matadouros, indústrias de processamento de alimentos, do processamento do couro

e indústrias de processamento de resíduos de aves. Lipases também estão envolvidas na solução de problemas ambientais tais como na degradação de gorduras de esgoto doméstico e digestores anaeróbios (HASAN et al., 2006).

Muitos microrganismos secretam lipases durante o seu crescimento em resíduos orgânicos, isso ocorre por que esses restos constituem uma fonte significativa de nutrientes residuais que servem como meio de crescimento para os microrganismos capazes de produzir lipases. No entanto, a disponibilidade de lipases que tenham características apropriadas para uma aplicação específica é ainda um fator limitante. Sendo assim, a identificação de condições para melhoria de sua produção através de matérias-primas baratas continuam a ser importantes tópicos de pesquisa. A utilização e reciclagem de recursos renováveis levam ao que tem sido denominado de “tecnologia limpa”. Esta é considerada uma técnica em que os materiais que representam uma ameaça para o meio ambiente são sistematicamente usados para promover a produtividade dos recursos necessários para tornar a atividade humana sustentável (SALIHU et al., 2012).

3.5 FARELO DE SOJA

As tortas residuais obtidas de processos de extração de óleo são amplamente utilizadas tanto para alimentação animal por serem uma boa fonte de proteínas, quanto para a utilização na forma de substratos em bioprocessos (RIGO et al., 2009). O farelo de soja, principal subproduto da cadeia produtiva de soja, é obtido a partir da extração do grão para a produção de óleo de soja, possuindo uma grande importância no mercado agropecuário nacional e mundial. O processo de obtenção do farelo de soja se procede com os grãos seguindo etapas de silagem, limpeza, secagem dos grãos, quebra dos grãos, cozimento, laminação, expansão, extração, dessolventização - tostagem, secagem, peletização, moagem e expedição (LUZ et al., 2006).

A composição química e o valor energético do farelo de soja são variáveis, de acordo com Rieger et al., (2008), que em seu trabalho, determinou os valores bromatológicos de diferentes farelos de soja do oeste e sudoeste do Paraná. A

umidade média encontrada nas variedades de farelo de soja foi de 11,42%, a proteína bruta de 45,59%, o teor de lipídeos de 1,76%, o teor de fibra totais de 17,78% e o material mineral em torno de 5,48%.

Sua importância é atribuída ao seu alto rendimento, estando o Brasil em segundo lugar no *ranking* mundial dos maiores produtores de soja. De acordo com o ministério da agricultura, a produção de farelo de soja na safra de 2012/2013 equivaleu a 27,3 milhões de toneladas (BRASIL, 2014), e a produção da safra de 2013/2014 foi de 28,75 milhões de toneladas (ABIOVE, 2015).

Na literatura estão descritos vários trabalhos que fazem uso do farelo de soja como substrato na fermentação sólida visando à obtenção de enzimas, entre outros produtos. No estudo de Chantasartrasamee et al., (2005) os autores avaliaram a atividade da enzima fitase, produzida por *Aspergillus oryzae* cultivado em três meios sólidos diferentes (farelo de soja, farelo de arroz e farelo de trigo), todos acrescidos com farinha de arroz. A maior atividade foi obtida quando o meio foi composto de 10 g de farelo de soja, enriquecido com 3 g de farinha de arroz. O farelo de soja entre outros substratos, também foi usado para fermentação sólida na produção de Lovastatina (fármaco) a partir do fungo *Aspergillus flavipes* como descreve Valera et al., (2005). Em outro exemplo, o farelo de soja foi usado como suporte para a produção e caracterização bioquímica da enzima protease, produzida pelo microrganismo *Aspergillus oryzae* (CASTRO; SATO, 2013).

Especificamente, para a produção de lipase, existem trabalhos científicos que utilizam o resíduo de farelo de soja como substrato para fermentação sólida. No trabalho de Wolski et al., (2009) foi realizada a comparação entre a fermentação sólida e a fermentação submersa do farelo de soja pelo microrganismo isolado *Penicillium* sp. na produção de lipase. Neste estudo, os autores observaram um melhor desempenho da fermentação sólida em relação à submersa por meio dos maiores valores de atividade hidrolítica. Já os autores Menoncin et al., (2010) realizaram a extração, concentração e a purificação parcial de uma lipase obtida do fungo *Penicillium verrucosum* usando a fermentação em estado sólido do farelo de soja.

3.6 OKARA

Por mais de 1000 anos pessoas em toda Ásia tem consumido alimentos derivados da produção de soja em sua dieta e nos últimos 25 anos, esses alimentos de soja tem sido igualmente incorporados na dieta de culturas ocidentais. Devido o aumento da procura por produtos derivados da soja, a mesma pode ser considerada como uma fonte de matéria-prima para a indústria de processamento (MARTOS; RUPÉREZ, 2008).

As diversas formas de processamento do grão de soja geram diferentes tipos de subprodutos ou co-produtos. No processo de produção do extrato aquoso de soja (popularmente conhecido como leite de soja) bem como do 'tofú' é originado um sub-produto de baixo valor comercial conhecido comercialmente como *okara* (BOWLES, DEMIATE, 2006). O *okara* bruto, também chamado de polpa de soja, é um material semissólido, com aspecto branco amarelado que consiste da parte insolúvel que sobra da extração da soja com água quente (WACHIRAPHANSKUL; DEVAHASTIN, 2007; APARICIO et al., 2010; JANKOWIAK et al., 2014). Alguns autores estimam que a partir de cada tonelada de soja processada, aproximadamente sete toneladas de extrato hidrossolúvel bem como uma a duas toneladas de *okara* são produzidos (ESPINOSA-MARTOS; RUPÉREZ, 2008; REKHA; VIJAYALAKSHMI, 2011; SU et al., 2013).

A produção de leite de soja e de tofú, são responsáveis por geração de grandes quantidades de resíduos de soja. Em função de seu elevado teor de umidade (aproximadamente 80%) o *okara* se torna difícil de manusear tornando custoso o processo de secagem. A alta umidade do *okara*, o torna altamente suscetível à putrefação, levando muitos países à eliminação do mesmo de forma inadequada, ocasionando sérios problemas ambientais (CUENCA; SUÁREZ; APARICIO, 2008). Porém, esta biomassa já vem sendo utilizada na alimentação humana bem como na alimentação de animais, por ser rica em compostos insolúveis em água, proteínas, lipídeos, amido e açúcar. Isso permite que sejam potencialmente utilizados em outros ramos tecnológicos, como por exemplo, em meios de cultivo de alta qualidade para fermentação microbiana. O valor dos resíduos de soja para a produção de ácido orgânico, enzimas e proteínas passa a ser enaltecida na indústria da fermentação (HSIEH, 2004).

A composição proximal do *okara* depende da quantidade de água presente na soja ainda no solo, além da proporção de água adicionada para extrair os componentes solúveis (O'TOOLE, 1999). Autores relatam que o *okara* em base seca contém aproximadamente entre 42,5% e 60,0% de fibra alimentar, 29% e 37,0% de proteínas, 11,0% e 13,0% de lipídeos e 4,7% de carboidratos solúveis (BOWLES, DEMIATE, 2006; WACHIRAPHANSKUL; DEVAHASTIN, 2007).

Em seu trabalho, O'Toole, (1999) descreve vários estudos que utilizam *okara* no processamento de produtos não alimentícios. Alguns pesquisadores testaram o *okara* como base para fermentação. Em um dos estudos, o *okara* foi utilizado na fermentação em estado sólido para produção de um aminoácido que atua como fungicida em plantas. Em outro trabalho foi relatado que o uso de *okara* para o cultivo de *Penicillium* sp. também contribuiu para a produção de novos compostos que exibiram propriedades inseticidas.

Em sua pesquisa, Slivinsky et al., (2012) estudaram a produção de surfactina por *Bacillus pumilus* em fermentação em estado sólido, utilizando um meio à base de *okara* (bruto e hidrolizado) com a adição de bagaço de cana. A maior produção de surfactina foi com a utilização do *okara* hidrolizado na proporção de 1:1 com o bagaço de cana. O *okara* também foi utilizado como substrato na fermentação sólida para produção de ácido cítrico pelo fungo *Aspergillus niger*. Neste trabalho de Khare, Gandhi (1995) obtiveram quantidades apreciáveis de ácido cítrico, ou seja, 5,10 g de ácido cítrico / 100 g de meio.

Na literatura são escassos os trabalhos envolvendo *okara* como substrato para fermentação sólida na produção de enzimas, o que remete na possibilidade da realização de um trabalho com características inéditas a serem avaliadas e discutidas.

4 METODOLOGIA

4.1 FUNGOS

Quatro cepas de fungos filamentosos foram estudadas na produção de lipase por fermentação no estado sólido. Primeiramente, foi selecionada uma linhagem de fungo filamentoso (*Penicillium glabrum*) isolado de solo da mata Atlântica da estação ecológica Juréia-Itatins, Peruíbe, São Paulo. Tal microrganismo, identificado no trabalho como isolado J3, foi gentilmente fornecido pela professora Dra. Adriana Knob do Departamento de Biologia da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO). Além deste, foram selecionados dois fungos filamentosos isolados de salame colonial (identificados como isolados S1 e S4 (*Penincillum sp.*) oriundo do município de Pato Branco, Paraná. Por fim, foi selecionada uma cepa de fungo filamentoso (identificado como isolado E2) oriundo de um tanque de armazenamento de gordura de agroindústria produtora de ração animal, localizado na cidade de Cunha Porã – SC.

4.2 OKARA

A biomassa *okara* foi gentilmente doada por uma agroindústria produtora de extrato hidrossolúvel de soja, localizada no município de Realeza – PR. Tal material é componente residual no processo de obtenção do extrato hidrossolúvel de soja. A amostra foi coletada de um único lote e armazenada *in natura* em potes de polietileno sob refrigeração de 4°C até seu uso.

4.3 FARELO DE SOJA

O farelo de soja foi doado por uma cooperativa produtora de óleo de soja localizada no município de Clevelândia – PR. O material foi coletado em um único lote e embalado em três amostras com aproximadamente 1 kg cada. Assim que recebidas, as mesmas foram misturadas em uma única amostra e guardadas em potes de polietileno sob refrigeração a 4°C.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS BIOMASSAS FARELO DE SOJA E OKARA ORIUNDOS DO PROCESSAMENTO DE SOJA

As amostras de *okara* e farelo de soja foram caracterizadas quanto os seguintes parâmetros físico-químicos: umidade, resíduo mineral fixo, lipídeos, proteínas, fibra bruta, atividade de água. Além disso, foram realizadas análises por microscopia de varredura eletrônica (MEV) e análise no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

4.4.1 Teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada pelo método gravimétrico (AOAC, 2007). Foram pesadas cerca de 5 g da amostra e submetida à secagem em estufa com circulação de ar a 105°C até massa constante por aproximadamente 5 horas.

4.4.2 Resíduo mineral fixo

A determinação do conteúdo de resíduo mineral fixo seguiu protocolo gravimétrico após incineração das amostras em forno mufla a 550 °C (AOAC, 2007).

4.4.3 Lipídeos

O conteúdo de lipídeos foi determinado pelo método Soxhlet, através de extração da fração lipídica com solvente extrator éter etílico em equipamento do tipo Soxhlet (extração por refluxo). Após extração o solvente foi evaporado em chapa aquecedora e dessecador até massa constante da fração lipídica. O teor de lipídeos foi obtido pela relação da massa da fração lipídica seca com a massa inicial da amostra (AOAC, 2007).

4.4.4 Proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo método Kjeldahl modificado, o qual consiste na determinação do teor de nitrogênio total e posterior conversão para proteínas por fator de conversão (6,25). A análise foi realizada em três etapas consecutivas: digestão, destilação e titulação. A digestão foi realizada em bloco digestor (450 °C) sendo usado 0,2 g de amostra, 25 mL de ácido sulfúrico concentrado (P.A) e 6,0 g do catalisador (mistura catalítica: dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3:0,3:6). Na etapa de destilação, foram adicionados 20 mL de solução de hidróxido de sódio (40% m/v) e, com ação do aquecimento do destilador, a amônia foi destilada sobre 10 mL de uma solução de ácido bórico (3% m/v) na presença de indicador, formando borato de amônia. Na etapa de titulação, o borato de amônia formado foi titulado com uma solução padronizada de ácido sulfúrico (0,05 mol / L) e o teor de proteínas foi determinado pela equação a seguir (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

$$Proteína\ total\ (\%) = \frac{V \times 0,14 \times 6,25}{m} \quad (2)$$

Em que:

V = volume gasto de ácido sulfúrico 0,05 mol / L

0,14 = equivalente-grama do nitrogênio

6,25 = fator de conversão de nitrogênio em proteína

m = massa da amostra

4.4.5 Fibra bruta

Para a determinação de fibra bruta, as amostras foram submetidas a digestão ácida e alcalina, e após filtração em cadinho de Gocch. As frações de fibra bruta foram determinadas por gravimetria (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.4.6 Atividade de água

Para determinação de atividade de água, as amostras brutas foram colocadas no suporte de amostra e submetidas à análise em aparelho analisador de atividade de água Novasina, modelo LabMaster (Reino Unido), previamente calibrado.

4.4.7 Obtenção das farinhas de *okara* e farelo de soja

As farinhas de *okara* e farelo de soja foram obtidas por desidratação das respectivas biomassas em estufa de secagem com circulação de ar em temperatura de 105°C por 5 horas. As farinhas secas foram trituradas em liquidificador industrial por 5 minutos, sendo posteriormente armazenadas em potes de polietileno sobre refrigeração em geladeira a 4°C.

4.4.8 Caracterização das farinhas de *okara* e farelo de soja por microscopia de varredura eletrônica

As amostras das farinhas foram inicialmente desidratadas a 105°C em estufa com circulação de ar. Pequena quantidade de amostra foi dispersa sobre fita de carbono e imagens por microscopia eletrônica de varredura foram obtidas em microscópio eletrônico de bancada Hitachi, modelo TM 3000 (JAPÃO).

4.4.9 Caracterização das farinhas de *okara* e farelo de soja por Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Os espectros de infravermelho das amostras desidratadas de *okara* e farelo de soja foram obtidos pelo método de discos de KBr em espectrofotômetro PerkinElmer, modelo Frontier (Estados Unidos), na região de 4000-400 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

Na etapa de preparo do KBr, o mesmo foi seco em mufla a 550 °C por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Na sequência foi macerado em grau de ágata, desidratado em estufa a 100°C por 24 horas e posteriormente mantido em dessecador até análise. Para a análise foi utilizado a proporção KBr:amostra de 100:1. Os discos de KBr : amostra foram preparados por prensagem (8 toneladas) e estes submetidos a análise em espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier.

4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LIPOLÍTICO DOS FUNGOS ISOLADOS

O potencial lipolítico dos microrganismos selecionados foi avaliado por fermentação sólida em meios constituídos pelos subprodutos *okara* ou farelo de soja. Para isso, empregaram-se ensaios pontuais (Figura 3), com o intuito de selecionar a melhor composição microrganismo/substrato para realizar a otimização da produção de enzimas lipolíticas.

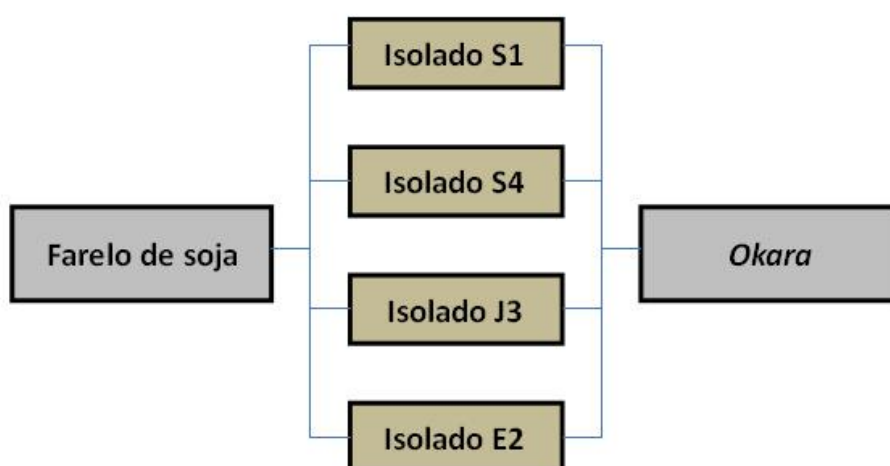


Figura 3 - Fluxograma das combinações entre os substratos e fungos selecionados.

Fonte: Autoria própria

A Figura 3 exibe o fluxograma das oito combinações entre os substratos e fungos selecionados. Os ensaios foram realizados em duplicada e os cultivos conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 10 g do substrato (farinha de *okara* ou farelo de soja). A umidade do meio foi ajustada para 60% (v/m) com solução tampão McIlvaine pH 6,0, a concentração de inóculo foi de 10^5 esporos / g de matéria seca, a temperatura de cultivo de 28 °C e tempo de 168 h.

4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE EM FERMENTAÇÃO SÓLIDA USANDO FARELO DE SOJA COMO SUBSTRATO

Com base nos resultados obtidos no item 4.5, foi selecionada a melhor condição (farelo de soja e isolado S4) que apresentou o melhor valor de atividade lipolítica a fim de se avaliar a produção de lipase em fermentação sólida empregando-se metodologia de planejamento fatorial. A influência das variáveis concentração de conídios (CC), umidade do meio (U) e tempo de cultivo (T), foi avaliada, de acordo com o delineamento composto central rotacional (2³) conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Delineamento composto central rotacional - 2³ utilizando farelo de soja como substrato

| Variáveis | Níveis de Variação | | | | |
|-----------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | -1,68 | -1 | 0 | +1 | +1,68 |
| CC (esporos/g*) | 1,0x10 ³ | 4,1x10 ⁴ | 1,0 x10 ⁵ | 6,0x10 ⁶ | 1,0x10 ⁷ |
| U (%) | 50 | 54 | 60 | 66 | 70 |
| T (dias) | 3,0 | 4,4 | 6,5 | 8,6 | 10,0 |

CC = concentração de conídios, U = umidade do meio, T = tempo de cultivo.

*por grama de matéria seca

Tabela 2 - Matriz do delineamento composto central rotacional 2³ utilizando farelo de soja como substrato

| Ensaio | CC (esporos/g*) | U (%) | T (dias) |
|--------|-----------------|-------|----------|
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | +1 | -1 | -1 |
| 3 | -1 | +1 | -1 |
| 4 | +1 | +1 | -1 |
| 5 | -1 | -1 | +1 |
| 6 | +1 | -1 | +1 |
| 7 | -1 | +1 | +1 |
| 8 | +1 | +1 | +1 |

| Ensaio | CC (esporos/g*) | U (%) | T (dias) |
|--------|-----------------|-------|----------|
| 9 | -1,68 | 0 | 0 |
| 10 | +1,68 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | -1,68 | 0 |
| 12 | 0 | +1,68 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | -1,68 |
| 14 | 0 | 0 | +1,68 |
| 15 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 0 | 0 |

CC = concentração de conídios, U = umidade do meio, T = tempo de cultivo.

*por grama de matéria seca

A Tabela 2 descreve a matriz do planejamento fatorial 2^3 com valores codificados e quatro pontos centrais. Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g do substrato com concentração de conídios e umidade de acordo com o delineamento experimental. Os frascos foram mantidos em incubadora à temperatura de 28 °C seguindo o tempo proposto pelo planejamento, em condições estacionárias (Figura 4). Os frascos foram previamente esterilizados a 121 °C por 15 minutos.



Figura 4 – Cultivo em meio sólido

Fonte: Aatoria própria

4.7 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS ORIUNDO DAS FERMENTAÇÕES SÓLIDAS

Após fermentações empregando as condições otimizadas de fermentação sólida, os extratos enzimáticos foram obtidos seguindo protocolo descrito por Ferraz et al., (2012) com adaptações. A extração foi conduzida por meio da adição de tampão McIlvaine pH 6,0 na biomassa fermentada na proporção de 1:5 (m/v), sob agitação em *Shaker* à 150 rpm por uma hora a 35 °C. O extrato bruto foi recuperado por filtração em papel filtro quantitativo.

4.8 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXTRATO BRUTO

4.8.1. Determinação de pH e temperatura ótimos

Para determinação da melhor temperatura para atividade hidrolítica do extrato bruto, foram estudadas diferentes condições de temperatura (5, 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 °C) em pH 8,0 seguindo as condições padrão de análise.

Para a determinação do pH ótimo, a atividade de lipase foi determinada em diferentes valores de pH (4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 e 11,0) empregando tampão citrato-fosfato (McIlvaine) nas faixas de pH de 4,0 a 8,0 e tampão glicina-NaOH 50 mM (pH 9,0 a 11,0) com período de incubação de 30 min em temperatura ótima previamente determinada. As análises foram realizadas em triplicata.

4.8.2 Estabilidade enzimática (lipase) em diferentes temperaturas e pH

A estabilidade térmica foi determinada após pré-incubação do extrato enzimático em temperaturas de 5°C acima e 5°C abaixo da temperatura ótima determinada e em diferentes intervalos de tempo (de 0 min a 240 min com intervalo de 30 min) em pH ótimo. Para avaliar a estabilidade do extrato enzimático em função do pH, o extrato enzimático diluído (1:1 v/v) em tampão McIlvaine foi incubado em valores de pH de (4,0 a 11,0) a temperatura de 4°C. A atividade residual de lipase foi determinada após 24 h. As análises foram realizadas em triplicata.

4.8.3 Efeito de íons metálicos sobre a atividade lipolítica

O efeito de íons metálicos sobre a atividade lipolítica nas concentrações 2 mM e 10 mM foi avaliado conforme descrito por Sun; Xu, (2009) com adaptação. Foram incubadas as soluções salinas de cada íon em concentração de 2 mM e 10 mM com o extrato bruto. As reações enzimáticas foram conduzidas em temperatura pré-estabelecida (temperatura ótima) por período de 30 min sendo avaliados os íons K^+ , Fe^{2+} , Co^{2+} , I^- , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+} . Como padrão foi utilizado o extrato enzimático sem os sais acima descritos. A este controle, considera-se 100% da atividade lipolítica. A relação do volume do extrato enzimático com as soluções de íons metálicos foi de 1:1 seguindo as condições normais de ensaio. As análises foram realizadas em triplicata.

4.8.4 Efeito de solventes orgânicos sobre atividade lipolítica

Foi avaliado o efeito de alguns solventes orgânicos sobre a atividade hidrolítica do extrato concentrado conforme protocolo de Demir; Tükel, (2010) com modificações. Foi incubado o extrato bruto em cada solução de solvente orgânico nas concentrações de 1% e 10% (v/v) em solução tampão do pH ótimo, por 30 min e em temperatura ótima. Foram testados os solventes hexano, metanol, acetona, propanol e DMSO. Como controle foi utilizado o extrato enzimático sem os solventes acima descritos. A este padrão, considera-se 100% da atividade lipolítica. A relação do volume do extrato enzimático com as soluções dos solventes orgânicos foi de 1:1 seguindo as condições normais de ensaio. As análises foram realizadas em triplicata.

4.9 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A avaliação da atividade lipolítica foi realizada pelo método descrito por Gupta et al., (2002) e Singh, Banerjee (2007) com modificações. Tal método baseia-

se na reação de hidrólise catalisada pela lipase de ésteres de *p*-nitrofenil, com formação de produto cromóforo *p*-nitrofenol.

A atividade lipolítica foi realizada por espectrofotometria usando *p*-nitrofenil-palmitato (pNPP, massa molar: 377,5 g.mol⁻¹) como substrato em um sistema em emulsão. O substrato (3 mg/mL de pNPP) foi dissolvido em isopropanol e DMSO (Dimetilsulfoxido) na proporção de 1:1 (v/v) e emulsionado com uma solução aquosa contendo 0,4444% de Triton X-100, 0,1111% de goma arábica, 0,395% de Tris-HCl (25 mM), e 0,1176% de CaCl₂ (8 mM). A emulsão foi preparada na proporção de 1 mL da solução do substrato, acrescidos de 9 mL da solução aquosa. Então, a mesma foi adicionada a cada amostra (100 µL de extrato enzimático + 900 µL da emulsão) em triplicata, e medida sua absorbância a 410 nm antes e após 30 minutos de incubação em estufa a 37 °C. Os cálculos de atividade lipolítica baseiam-se na variação de absorbância demonstrado pela Equação 1. Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a 1 µmol de *p*-nitrofenol liberado em um minuto de reação.

$$\text{Atividade enzimática (U.L}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta_{abs} \times 10 \times 10^6 \times 2}{12276} \quad (1)$$

Em que:

Δ_{abs} = variação de absorbância durante 30 minutos de ensaio;

10 = fator de diluição da enzima no meio reacional;

10⁶ = unidades do substrato produzidas no tempo de ensaio (µmol);

2 = fator para converter a atividade para atividade lipolítica/h;

12276 = coeficiente de extinção molar do substrato *p*-nitrofenol (ε).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS BIOMASSAS FARELO DE SOJA E OKARA

Os resultados da caracterização química-bromatológica (composição proximal) das biomassas farelo de soja e *okara* desidratados e moídos (Figura 5) em base seca, estão demonstrados na Tabela 3.



Figura 5 - Farelo de soja (A); *Okara* desidratado (B)

Fonte: Autoria própria

Tabela 3 – Composição proximal das amostras de farinha de farelo de soja e *okara*

| Parâmetros Físico-Químicos [#] | Farelo de soja | | | <i>Okara</i> | | |
|---|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|----------------------|-----------------------------|
| | Resultados obtidos | Rieger et al., 2008 | Vargas et al., 2008 | Resultados obtidos | Bowles, Demiate 2006 | Redondo-Cuenca et al., 2008 |
| Umidade (%)* | 11,31 ± 0,07 | 11,50 | # | 87,60 ± 0,04 | # | # |
| Aw* | 0,68 | # | # | 0,98 | # | # |
| Umidade (%)**: | 4,37 ± 0,04 | # | # | 2,66 ± 0,50 | # | # |

| Parâmetros Físico-Químicos [#] | Farelo de soja | | | Okara | | |
|---|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|----------------------|-----------------------------|
| | Resultados obtidos | Rieger et al., 2008 | Vargas et al., 2008 | Resultados obtidos | Bowles, Demiate 2006 | Redondo-Cuenca et al., 2008 |
| Resíduo Mineral** (%): | 6,34 ± 0,01 | # | # | 2,88 ± 0,06 | 2,80 | # |
| Proteínas** (%) | 46,49 ± 1,42 | 45,59 | 42,50 | 27,39 ± 0,06 | 37,00 | 28,52 |
| Lipídeos** (%) | 2,63 ± 0,09 | 1,76 | 8,50 | 14,03 ± 0,73 | 13,00 | 9,84 |
| Fibra Bruta** (%) | 25,35 ± 0,34 | 17,80 | 10,00 | 22,14 ± 0,21 | 42,50 | 55,48 |

* Amostra *in natura*

** Amostra em base seca (farinha)

#Não determinado

O farelo de soja *in natura* apresentou baixo conteúdo de umidade (11,31%, m/m) e atividade de água (0,69). Resultados similares, em média 11,50% foram descritos por Rieger et al., (2008) em amostras de farelo de soja oriundas da região sudoeste e oeste do estado do Paraná. Baixo conteúdo de umidade contribui para maior estabilidade química e microbiológica da biomassa, auxiliando na manutenção da qualidade em condições de estocagem. Após o processo de secagem e moagem a farinha obtida do farelo apresentou conteúdo reduzido de umidade (4,37% m/m) e atividade de água de 0,19, valores estes que asseguram maior estabilidade à biomassa, considerando 0,60 o limite mínimo capaz de permitir o desenvolvimento de microrganismos (CHISTÉ et al., 2006).

Por outro lado, a amostra de *okara in natura* apresentou elevado conteúdo de umidade (87,6%) e alta atividade de água (0,98). Valores similares de umidade (entre 81,7 % e 84,5 %) são descritos por Li; Qiao; Lu, (2012) em *okara* que foram adicionadas a outras farinhas convencionais para produção de produtos alimentícios com maiores conteúdos de fibra e proteína. Lu; Liu; Li, (2013) também descrevem valores semelhantes de umidade (81,6%) em *okara* obtido da linha de produção de *tofu* na China. O elevado conteúdo de umidade da biomassa *okara* associada a sua composição química são os fatores que a caracterizam como material de elevada perecibilidade. Processos de secagem podem contribuir para maior estabilidade da biomassa e viabilizar seu uso em maior escala. De fato, após o processo de secagem, a biomassa *okara* (farinha) apresentou teor de umidade de 2,66% e atividade de água de 0,65 no presente trabalho.

Neste contexto, são relatados na literatura diversos trabalhos que utilizam o *okara* desidratado. Grizotto et al., (2012) produziram farinha de *okara* por

desidratação da biomassa bruta e utilizaram como ingrediente na produção de salsichas tipo *Frankfurter*. Os autores Madrona; Almeida, (2008) também utilizaram o *okara* desidratado, como ingrediente base para a produção de biscoitos tipo *cookies*. Cunha et al., (2010), empregaram farinha de *okara* no preparo de barras de cereais, as quais apresentaram elevada qualidade nutricional e boa aceitação sensorial. Similarmente, Baú et al., (2010) descreveram o aproveitamento tecnológico do *okara* desidratado na produção de barras alimentícias com elevado valor proteico.

Com relação ao conteúdo mineral, foram verificados maiores teores no farelo de soja (6,34%) do que no *okara* (2,88%). O menor conteúdo de resíduo mineral do *okara*, possivelmente está associado ao processo na qual esta biomassa é processada, uma vez que a soja é moída e submetida a cozimento para extração do extrato hidrossolúvel durante processamento industrial.

Ambas as biomassas caracterizam-se como materiais de elevados conteúdos proteicos. O farelo de soja apresentou teores de 46,49% de proteína total e o *okara* 27,39%. Rieger et al., (2008) e Vargas et al., (2008) descreveram valores bastante similares de conteúdo proteico para o farelo de soja (45,59% e 42,50%, respectivamente) em comparação aos verificados no presente estudo. Bowles; Demiate, (2006) obtiveram, por outro lado, valores superiores (37%) para o substrato *okara*, em relação aos encontrados neste trabalho.

Como esperado, o farelo de soja apresentou conteúdos de lipídeos (2,63%) bem inferiores aos observados no *okara* (14,03 %). Tal condição é devido à eficiência do processo de extração do óleo de soja no qual o farelo é gerado como um subproduto na indústria de óleo de soja.

Tanto o farelo de soja como o *okara* apresentaram conteúdos apreciáveis de fibra bruta (25,35% e 22,14%, respectivamente). Os elevados conteúdos de fibra estão associados à composição destas biomassas, mais especificamente aos conteúdos de celulose, hemicelulose e lignina presentes na parede celular dos grãos de soja (SEIBEL; BELÉIA, 2009). Rieger et al., (2008) verificou valores inferiores de fibra bruta (17,8%) em amostras de farelo e Bowles, Demiate (2006) verificaram valores superiores (42,50%) aos observados neste trabalho.

Cabe salientar que a composição proximal do farelo e do *okara* está diretamente associada tanto à características inerentes ao processo de industrialização da soja, como também às características da composição química da soja utilizada no beneficiamento. Neste sentido, pode haver grandes variações de

composição entre biomassas oriundas de diferentes indústrias e processos (GRIESHOP; FAHEY, 2001; CUENCA; SUÁREZ; APARICIO, 2008).

5.1.1 Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das biomassas *okara* e farelo de soja

Na Figura 6, estão demonstradas as micrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura das amostras de *okara* e farelo de soja.

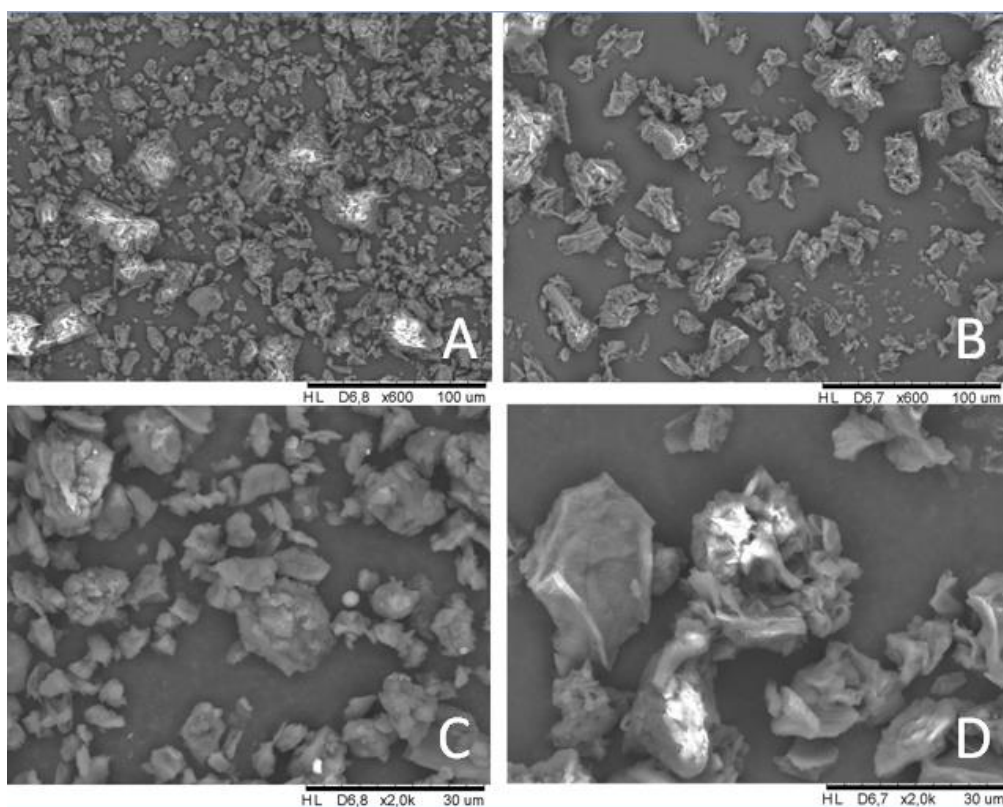


Figura 6 – Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura: farelo de soja com ampliação de 600x (A) e ampliação de 2000x (C); *okara* com ampliação de 600x (B) e ampliação de 2000x (D).

Fonte: Autoria própria

As imagens de MEV demonstram que as farinhas de *okara* e farelo de soja apresentam partículas fragmentadas com dimensões e formas irregulares. A superfície de cada fragmento também apresenta uma morfologia bastante irregular com reentrâncias ao longo da superfície. As superfícies irregulares das partículas, associada às dimensões diminutas das mesmas, podem contribuir para melhor colonização microbiana, potencializando o uso destas biomassas como substratos em fermentações sólidas. Outro aspecto que pode ser mencionado é que as partículas de *okara* apresentaram dimensões um pouco superiores ao do farelo de soja.

5.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Nas Figuras 7 e 8 estão demonstrados os espectros de infravermelho das amostras de *okara* e farelo de soja, respectivamente.

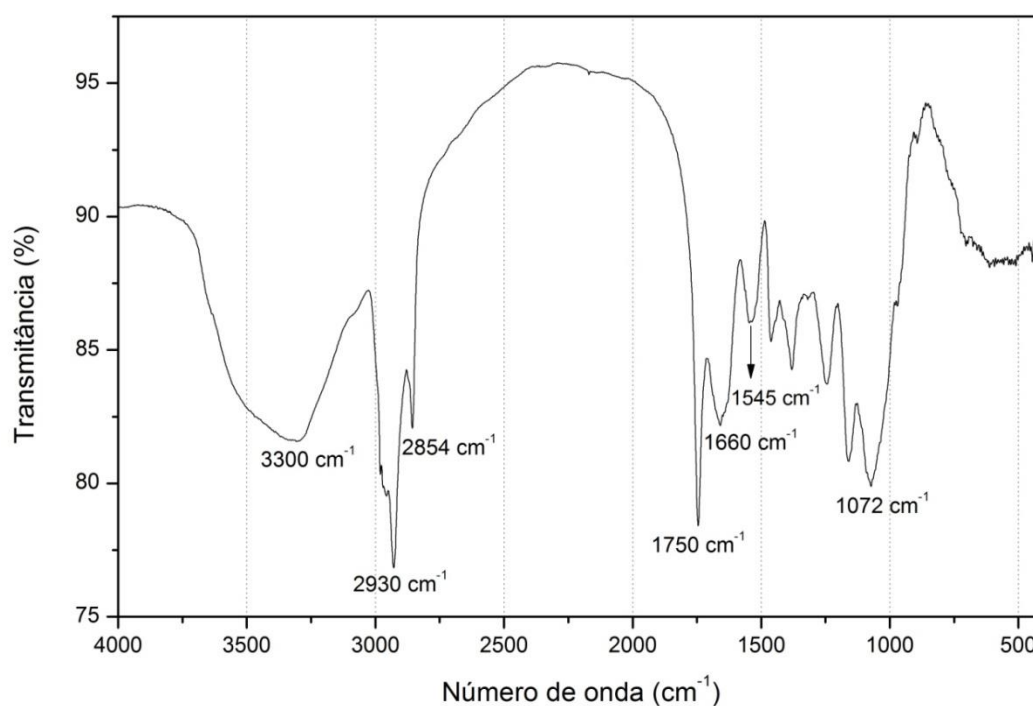


Figura 7 – Espectro de infravermelho do substrato *okara*.

Fonte: Autoria própria

No espectro de FTIR da amostra de *okara* é verificada uma banda larga em 3300 cm^{-1} , que corresponde a vibrações de alongamento de O-H que pode estar associada à presença de grupos carboxilas de aminoácidos e proteínas.

O pico observado em 1660 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O e foi atribuído à carbonila de amida primária, assim como a frequência de vibração próximo a 1550 cm^{-1} atribuída a deformação do grupo N-H de amida secundária. As frequências de vibrações entre $1750\text{-}1725\text{ cm}^{-1}$ é atribuído ao estiramento de carbonilas presentes em ésteres. Tais resultados corroboram com os dados descritos por Aparicio et al., (2010), os quais analisaram amostras de *okara in natura* e parcialmente hidrolisada e salientam as frequências de vibrações em 3300 cm^{-1} (alongamento de O-H), 1655 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$) e 1550 cm^{-1} ($\delta\text{N-H}$).

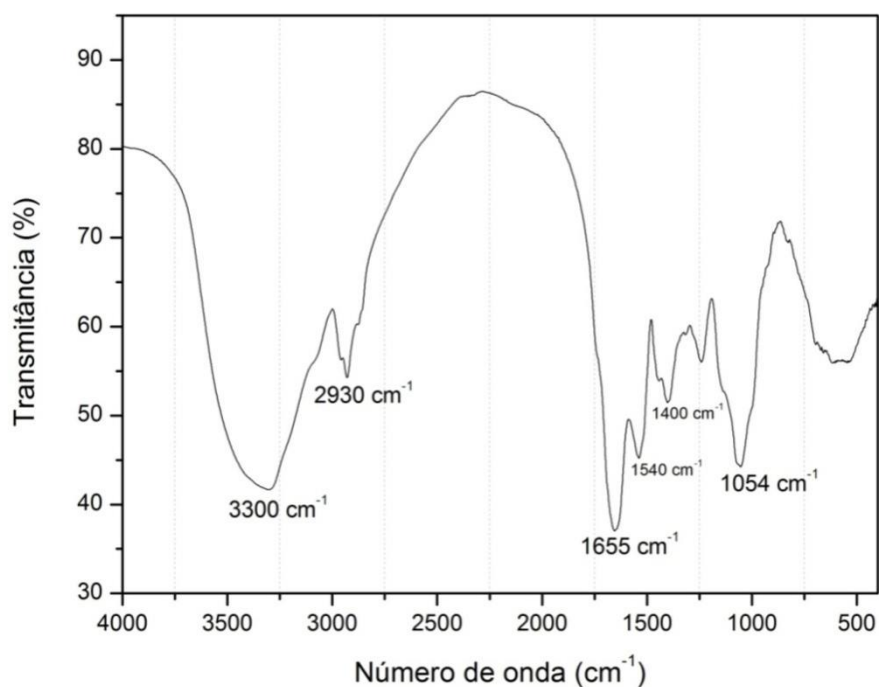


Figura 8 – Espectro de infravermelho do substrato farelo de soja

Fonte: Autoria própria

A banda de absorção forte em 3300 cm^{-1} é atribuída a vibrações de alongamento de O-H. O pico em 2930 cm^{-1} é atribuído ao estiramento da ligação C-H dos grupos CH_2 . A banda em 1655 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O,

conhecida como banda de amida primária e a banda em 1540 cm^{-1} corresponde a deformação N-H, conhecida como banda de amida secundária (APARICIO et al., 2010). As bandas verificadas na região de 1450 cm^{-1} e 1375 cm^{-1} corresponde a deformação do grupo $-\text{CH}_3$. As bandas entre $1550 - 1480\text{ cm}^{-1}$ correspondem à deformação assimétrica do grupo NH_3 de aminoácidos. A banda observada entre $1425 - 1390\text{ cm}^{-1}$ é típica de aminoácidos e seus sais e corresponde ao estiramento simétrico de $-\text{COO}-$ (BARBOSA, 2008).

5.3 POTENCIAL LIPOLÍTICO DOS FUNGOS ISOLADOS

O potencial lipolítico dos quatro isolados fúngicos estudados (isolados S1, S4, J3 e E2) foi avaliado através de fermentações no estado sólido. Foram conduzidos oito ensaios fermentativos e na tabela 4 estão descritos os resultados de atividade lipolítica expressos em $\text{U.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$. As médias de cada ensaio foram comparadas em um nível de significância de 95%.

Tabela 4 – Resultados de atividade lipolítica

| Ensaio | Substrato | Isolado | Atividade lipolítica (U.L^{-1}) |
|--------|----------------|---------|--|
| 1 | Okara | S1 | $15,92^e \pm 1,04$ |
| 2 | Okara | J3 | $30,09^{d,c} \pm 0,76$ |
| 3 | Okara | S4 | $15,73^e \pm 0,65$ |
| 4 | Okara | E2 | $49,80^b \pm 0,65$ |
| 5 | Farelo de soja | S4 | $62,31^a \pm 8,11$ |
| 6 | Farelo de soja | S1 | $41,08^{b,c} \pm 5,59$ |
| 7 | Farelo de soja | J3 | $42,46^b \pm 3,48$ |
| 8 | Farelo de soja | E2 | $20,90^{e,d} \pm 2,01$ |

Letras iguais denotam que não há diferença estatística significativa, letras diferentes denotam que há diferença estatística entre as espécies químicas analisadas ($p < 0,05$).

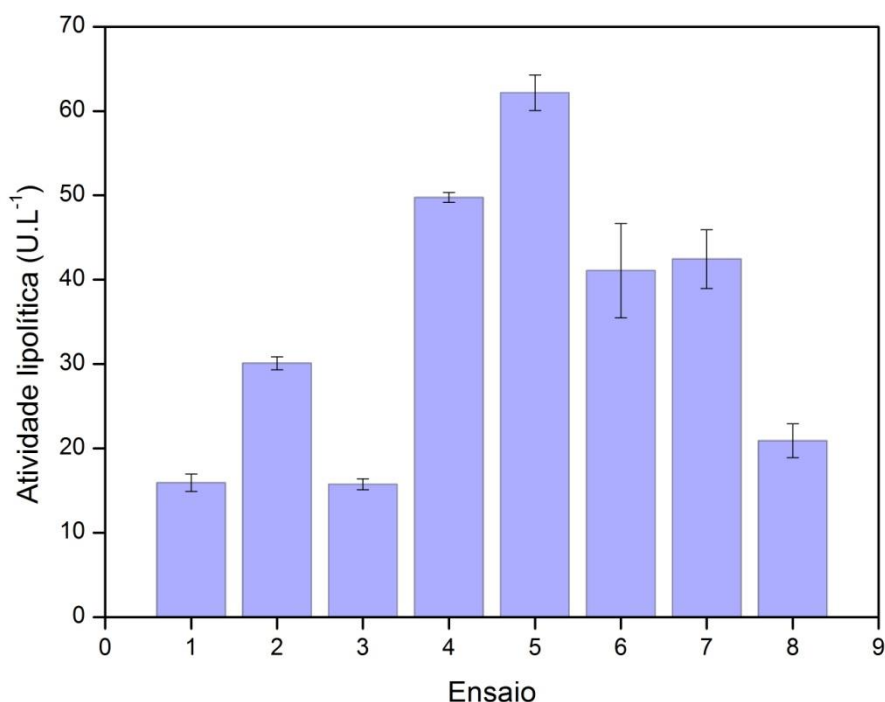


Gráfico 1 - Atividade lipolítica (U.L⁻¹) observada na fermentação no estado sólido

A partir dos resultados expressos na tabela 4 e também ilustrados no gráfico 1, pode ser observado que a maior atividade lipolítica foi obtida no ensaio 5 (62,31 U.L⁻¹). Desta forma, este ensaio, composto pelo farelo de soja e o isolado S4 foi considerado como modelo para o estudo de definição das melhores condições na produção de lipase, seguindo delineamento composto central rotacional (2³). Ou seja, optou-se por definir as melhores condições de cultivo para maior atividade lipolítica em experimentos usando o farelo de soja como substrato e o isolado S4 (*Penicillium sp.*)

A menor produção lipolítica (15,73 U.L⁻¹) foi verificada no ensaio 3, no qual foi avaliada a biomassa *okara* e o isolado S4.

Alguns pesquisadores descrevem fermentação no estado sólido do farelo de soja objetivando a produção de enzimas lipolíticas. Rigo et al., (2010) conduziram ensaios de produção de lipase por fermentação sólida do farelo de soja com diferentes suplementações. A produção máxima de lipase foi alcançada (40,74 U.mL⁻¹ ou 4,0.10⁴ U.L⁻¹) quando o meio foi suplementado com ureia (1% m/m) e óleo de soja (0,33% m/m). Singh et al., (2014) realizaram a fermentação no estado sólido

de sementes de Leucena (*Leucaena leucocephala*) e farelo de soja pelo fungo *Schizophyllum commune*. Os autores realizaram a suplementação do meio (meio mínimo de Vogel 1:4 v/v e tributirina 1% m/v) e obtiveram atividade no extrato bruto não purificado de 14,65 U.mL⁻¹ (1,46.10⁴ U.L⁻¹) para as sementes de Leucena, e 9,51 U.mL⁻¹ (9,51.10³ U.L⁻¹) para o farelo de soja.

Os valores relativamente baixos de atividade lipolítica verificadas nos ensaios do presente estudo em relação aos dados descritos na literatura, podem, em parte, ser justificados pela não suplementação do meio com fonte de nitrogênio, fonte mineral, fonte de carboidratos assimiláveis como glicose ou uso de algum agente indutor como óleo vegetal. De fato, buscando o uso de um meio de cultivo de baixo custo, optou-se pelo uso apenas do subproduto agroindustrial como substrato. O meio formulado sem qualquer suplementação foi proposto a fim de se verificar a possibilidade da produção de enzimas lipolíticas de alto valor agregado utilizando apenas o resíduo agroindustrial como fonte de nutrientes.

Lipases fúngicas podem ter sua produção fortemente afetada por fatores nutricionais, já que os mesmos são cruciais para a produção enzimática. Pequenas alterações na relação carbono/nitrogênio levam a grandes variações nos valores de atividade lipolítica (LI; ZONG, 2010). A fonte de nitrogênio orgânico e inorgânico e sais minerais também são importantes e devem ser considerados para o crescimento e otimização da produção enzimática (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Alguns nutrientes podem se apresentar em quantidades insuficientes, ou até mesmo estarem ausentes no substrato. Nestes casos, é necessária suplementação externa, ou até mesmo, um pré-tratamento no substrato antes de usá-lo para a produção enzimática. Exemplos de pré-tratamentos, seriam a hidrólise química, redução do tamanho das partículas por trituração ou corte, além de tratamentos pelo uso de calor (PANDEY et al., 1999).

5.4 DEFINIÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES PARA PRODUÇÃO DE LIPASE USANDO O FARELO DE SOJA COMO SUBSTRATO

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) (2³) foi empregado para estabelecer as melhores condições para produção de lipase em relação aos parâmetros concentração de conídios ([CC]), umidade (U) e tempo de cultivo (T) em fermentações no estado sólido.

Os valores codificados e reais das variáveis estudadas bem como os resultados de atividade lipolítica verificada nos ensaios do planejamento experimental empregado estão demonstrados na tabela 5. Os tratamentos 1 a 18 correspondem ao delineamento experimental, e o ensaio 19 refere-se ao protocolo de validação do modelo experimental.

Tabela 5 - Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para avaliação da influencia das variáveis concentração de esporos (CC), umidade (U) e tempo (T) sobre a atividade lipolítica pelo isolado S4 (*Penicillium sp.*)

| Valores reais (codificados) | | | | |
|-----------------------------|---|-------------|--------------|---|
| Ensaio | Concentração de esporos (esporos.mL ⁻¹) | Umidade (%) | Tempo (dias) | Atividade lipolítica (U.L ⁻¹) |
| 1 | 4,1x10 ⁵ (-1) | 54,0 (-1) | 4,4 (-1) | 73,85 ± 3,48 |
| 2 | 6,0x10 ⁷ (+1) | 54,0 (-1) | 4,4 (-1) | 42,15 ± 3,07 |
| 3 | 4,1x10 ⁵ (-1) | 66,0 (+1) | 4,4 (-1) | 24,46 ± 1,38 |
| 4 | 6,0x10 ⁷ (+1) | 66,0 (+1) | 4,4 (-1) | 36,62 ± 2,36 |
| 5 | 4,1x10 ⁵ (-1) | 54,0 (-1) | 8,6 (+1) | 28,15 ± 2,01 |
| 6 | 6,0x10 ⁷ (+1) | 54,0 (-1) | 8,6 (+1) | 53,54 ± 2,11 |
| 7 | 4,1x10 ⁵ (-1) | 66,0 (+1) | 8,6 (+1) | 32,62 ± 3,14 |
| 8 | 6,0x10 ⁷ (+1) | 66,0 (+1) | 8,6 (+1) | 43,23 ± 0,96 |
| 9 | 1,0x10 ⁴ (-1,68) | 60,0 (0) | 6,5 (0) | 22,31 ± 2,32 |
| 10 | 1,0x10 ⁸ (+1,68) | 60,0 (0) | 6,5 (0) | 44,31 ± 4,23 |
| 11 | 1,0x10 ⁶ (0) | 50 (-1,68) | 6,5 (0) | 63,85 ± 3,70 |
| 12 | 1,0x10 ⁶ (0) | 70 (+1,68) | 6,5 (0) | 28,15 ± 3,77 |
| 13 | 1,0x10 ⁶ (0) | 60,0 (0) | 3,0 (-1,68) | 23,38 ± 0,53 |
| 14 | 1,0x10 ⁶ (0) | 60,0 (0) | 10,0 (1,68) | 33,08 ± 1,62 |
| 15 | 1,0x10 ⁶ (0) | 60,0 (0) | 6,5 (0) | 11,54 ± 0,46 |
| 16 | 1,0x10 ⁶ (0) | 60,0 (0) | 6,5 (0) | 25,54 ± 0,70 |

| Valores reais (codificados) | | | | |
|-----------------------------|---|-------------|--------------|---|
| Ensaio | Concentração de esporos (esporos.mL ⁻¹) | Umidade (%) | Tempo (dias) | Atividade lipolítica (U.L ⁻¹) |
| 17 | 1,0x10 ⁶ (0) | 60,0 (0) | 6,5 (0) | 16,92 ± 2,61 |
| 18 | 1,0x10 ⁶ (0) | 60,0 (0) | 6,5 (0) | 14,46 ± 1,86 |
| 19 | 4,1x10 ⁵ | 54,0 | 4,4 | 57,68 ± 1,58 |

Os números entre parênteses nas linhas 1 a 18 representam os níveis do planejamento experimental rotacional DCCR 2³

A análise de variância (ANOVA) dos dados do delineamento experimental estão demonstrados na tabela 6. O modelo matemático da atividade lipolítica foi significativo em um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). O teste F indica que o modelo é preditivo, uma vez que o valor de F calculado foi superior ao valor de F tabelado. Foi verificado um coeficiente de determinação (R^2) de 0,8012, ou seja, 80,12% da variabilidade dos dados é explicado pelo modelo. Considerando tratar-se de ensaio biológico tal coeficiente de ajuste pode ser aceito como adequado.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) e coeficientes de regressão dos dados do planejamento DCCR 2³

| Termos | SQ | gl | QM | F | F _{tab} | F/F _{tab} |
|----------------|--------|----|---------|-------|------------------|--------------------|
| M | 12886 | 9 | 1431,72 | 19,71 | 2,12 | 9,29 |
| R | 3196 | 44 | 72,63 | - | - | - |
| T | 16082 | 53 | - | - | - | - |
| R ² | 0,8012 | - | - | - | - | - |

| Termos | Coeficientes (Estimativa de efeito) | p-valor |
|-------------------|-------------------------------------|---------------|
| Média/Interc. | -52,08 | 0,2308 |
| [CC] | 712,74 | 0,0002 |
| [CC] ² | 18,38 | 0,0000 |
| U | 601,98 | 0,0013 |
| U ² | 22,14 | 0,0000 |
| T | 7,99 | 0,0665 |
| T ² | 149,64 | 0,0846 |
| [CC]xU | 7,27 | 0,0424 |
| [CC]xT | 701,27 | 0,0002 |

| Termos | Coeficientes (Estimativa de efeito) | p-valor |
|--------|-------------------------------------|---------------|
| UxT | 519,68 | 0,0009 |

M = modelo; R = resíduo; T = total; SQ = soma dos quadrados; QM = média dos quadrados; gl = grau de liberdade; $F = F$ calculado; $F_{tab} = F$ tabelado 5%; [CC] = concentração de conídios; U = umidade; T = tempo de cultivo. Os valores em negrito são estatisticamente significativos.

Os dados experimentais foram analisados por regressão linear múltipla, e o modelo matemático que representa a atividade lipolítica está representado pela equação 3, na qual foi considerado apenas os termos significativos ([CC] e U).

$$\text{Atividade lipolítica } (U/L) = -52,08 + 712,74 CC + 18,38 CC^2 + 601,98 U + 22,14 U^2 + 7,27 CCxU + 701,27 CCxT + 519,68 UxT \quad (3)$$

Os coeficientes de regressão estão apresentados na tabela 6 e pode ser observado que os termos lineares das variáveis independentes concentração de conídios ([CC]) e umidade (U) foram significativos para produção da lipase. Os coeficientes quadraticos também foram significativos para as mesmas variáveis, evidenciando que uma pequena variação nos fatores [CC] e U pode acarretar em uma grande diferença de atividade lipolítica. Por outro lado, o fator tempo não demonstrou efeito significativo ($p < 0,05$) linear ou quadrático, ou seja, a produção de lipase não é influenciada pelo tempo de cultivo.

Para uma melhor visualização dos efeitos linear e quadrático das variáveis estudadas, foi construído gráfico de Pareto (gráfico 2). O gráfico de Pareto permite visualizar de forma objetiva e clara os efeitos linear e quadrático, bem como as interações entre os fatores experimentais estudados.

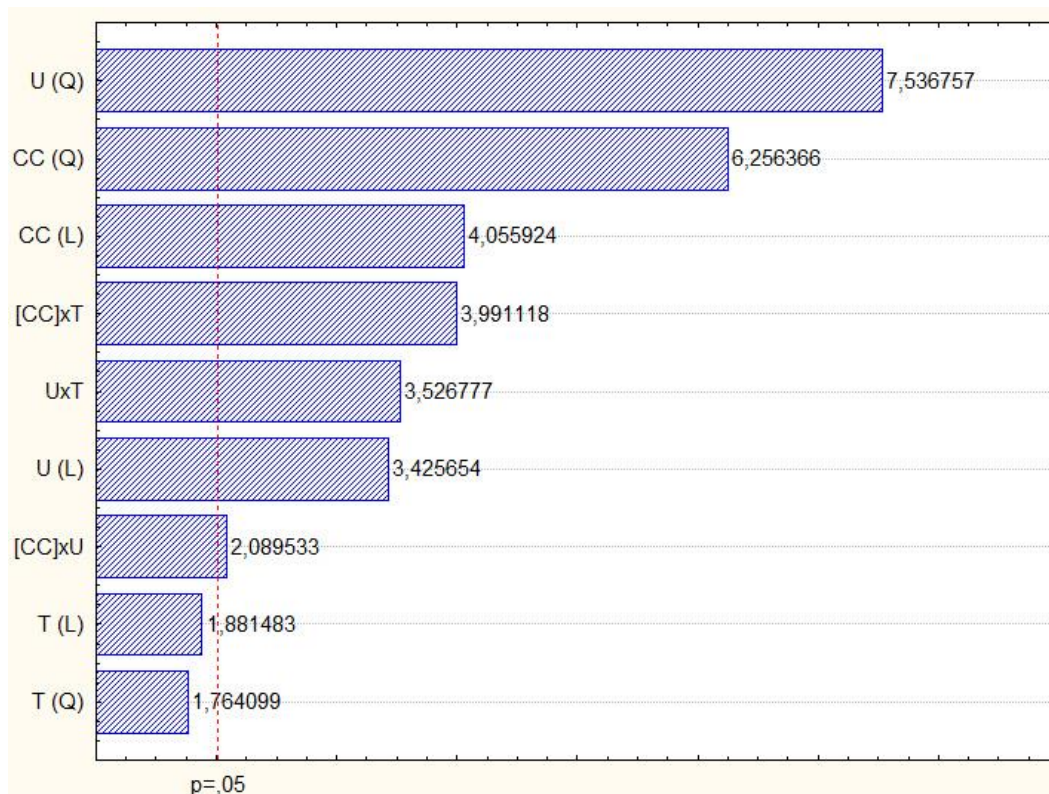


Gráfico 2 - Efeitos estimados da umidade (U), concentração de conídios (CC) e tempo de cultivo (T) sobre atividade lipolítica. U (L), [CC] (L) e T(L): efeito linear; U (Q), [CC] (Q) e T(Q): efeito quadrático; [CC]xT, UxT e [CC]xU: interação entre dois fatores.

Através do gráfico de Pareto pode ser verificado que as variáveis concentração de conídios e umidade tiveram efeito positivo e significativo ($p < 0,05$) tanto linear quanto quadrático sobre a atividade lipolítica. Os maiores valores de efeitos estimados através do modelo (equação 3) foram os efeitos quadráticos dos fatores umidade e concentração de conídios. Com relação ao efeito linear o parâmetro concentração de conídios demonstrou maior efeito do que o verificado em relação ao fator umidade. Assim como observado na tabela 6, o gráfico de Pareto demonstra que o tempo de cultivo não teve efeito significativo ao nível de 95% de confiança sobre a atividade de lipase.

Em todas as condições experimentais das fermentações no estado sólido estudadas pelo planejamento DCCR (2^3) (Tabela 6) foi constatado o potencial lipolítico do isolado fúngico. A atividade lipolítica variou de $11,54 \text{ U.L}^{-1}$ (ensaio 15) a $73,85 \text{ U.L}^{-1}$ (ensaio 1). O ensaio 1, no qual foram empregados os fatores [CC], U e T no nível -1, destacou-se por apresentar os melhores resultados de atividade lipolítica

entre os ensaios do delineamento experimental realizado. Por outro lado, no ensaio 15 onde foram empregados valores de variáveis no nível 0 (ponto central) foram verificados os menores valores de atividade de lipase.

Por meio da superfície de resposta e gráfico de contorno (figura 9) pode ser verificada tendência de maior atividade lipolítica quando empregada as condições de menor concentração conídios e menor umidade. De fato, observando-se os resultados descritos na tabela 5, os melhores resultados de atividade de lipase foram obtidos no ensaio 1.

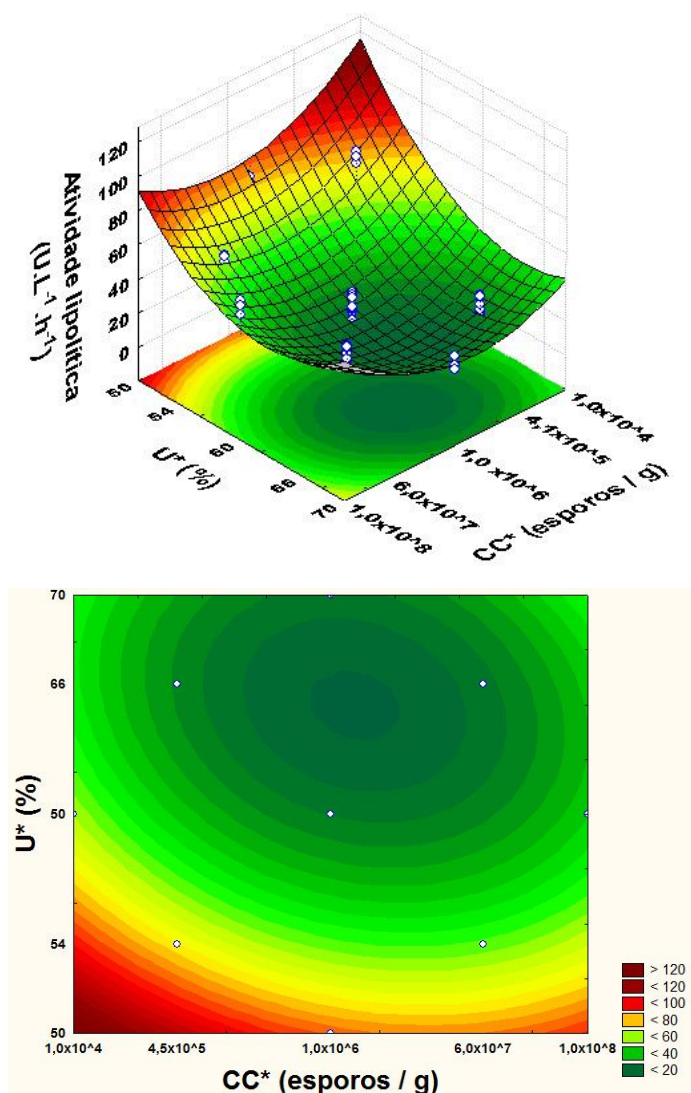


Figura 9 - Superfície de resposta e gráfico de contorno referente à atividade de lipase do isolado fúngico S4

Maiores valores de atividade lipolítica através da otimização da produção de lipase por FES são verificados na literatura. Vargas et al., (2008) após otimização do processo de produção enzimática por fermentação sólida do farelo de soja pelo fungo *Penicillium simplissimum*, obtiveram atividades de $2,48 \cdot 10^4$ U.L⁻¹. Imandi; Karanam; Garapati, (2013) após otimização da produção de lipase por FES em meio a base de torta de semente de mostarda pelo fungo *Yarrowia lipolytica* descreveram valor máximo de atividade de $5,78$ U.mL⁻¹ ($5,7 \cdot 10^3$ U.L⁻¹).

No entanto, cabe salientar que tais autores empregaram suplementação em seus processos. Vargas et al., (2008), utilizou meio a base de farelo de soja suplementado com fonte de carbono (óleo de soja) e nitrogênio (água de maceração de milho). Imandi; Karanam; Garapati, (2013) utilizaram a torta de semente de mostarda suplementada com uréia (1,5 % m/m), glicose (7% m/m) e sais mineirais.

5.5 VALIDAÇÃO DO MODELO

Para validação externa do modelo preditivo de produção de lipase pelo isolado fúngico foram correlacionados os valores médios de atividade enzimática verificadas no ensaio 19 com o valor predito pelo modelo matemático obtido a partir da superfície de resposta.

A atividade lipolítica média verificada no ensaio 19 foi de $57,68$ U.L⁻¹, a qual foi comparada com a atividade preditiva proveniente da modelagem que foi de $61,74$ U.L⁻¹, desta forma, a recuperação de atividade enzimática experimental em relação ao valor pretido pelo modelo foi de 93,42%.

O elevado valor de recuperação dos dados experimentais em relação ao modelo preditivo, indica adequado ajuste dos dados experimentais com o modelo matemático obtido, sendo o mesmo validado de forma satisfatória.

5.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXTRATO ENZIMÁTICO

5.5.1 Efeito da temperatura e estabilidade da enzima

Os resultados do efeito da temperatura sobre a atividade lipolítica estão representados no gráfico 3.

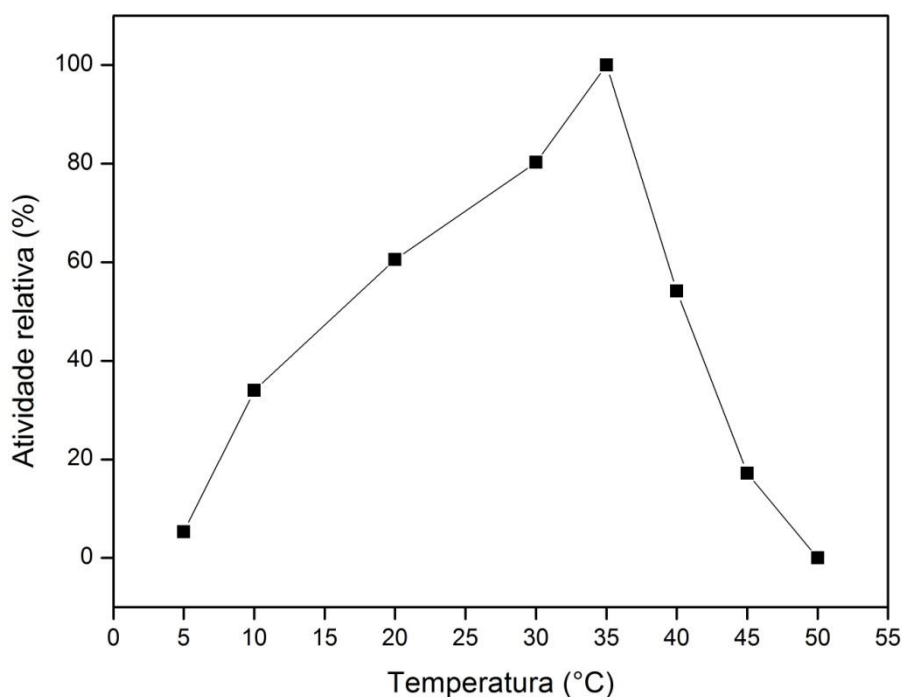


Gráfico 3 - Efeito da temperatura sobre a atividade lipolítica

O extrato enzimático obtido apresentou atividade lipolítica entre as temperaturas de 5°C a 45°C, com máxima atividade enzimática em 35°C. Entre as temperaturas 20°C e 40°C foram verificadas atividades relativas superior a 50%. Por outro lado, menores atividades foram observadas quando o extrato enzimático foi incubado em temperaturas entre 5°C e 10°C, bem como em temperaturas superiores

a 45°C. Na literatura são encontrados estudos que descrevem lipases com perfil semelhante quanto a temperatura ótima de atividade enzimática. Abbas et al., (2002) descreveram a mesma temperatura ótima (35°C) de atividade de lipase purificada produzida pelo fungo *Mucor sp.* Similarmente, Liu et al., (2008), verificaram atividade lipolítica em temperaturas entre 25°C e 50°C e temperatura ótima de atividade de 35°C em lipase purificada produzida pela bactéria *Aureobasidium pullulans*. Já, na caracterização bioquímica de uma lipase halotolerante produzida pela bactéria ácido láctica *Lactobacillus plantarum*, foi descrita por Torres et al., (2015) temperatura ótima de atividade um pouco superior (40°C).

O gráfico 4 apresenta os resultados referentes a estabilidade da enzima (atividade residual) em diferentes temperaturas de incubação.

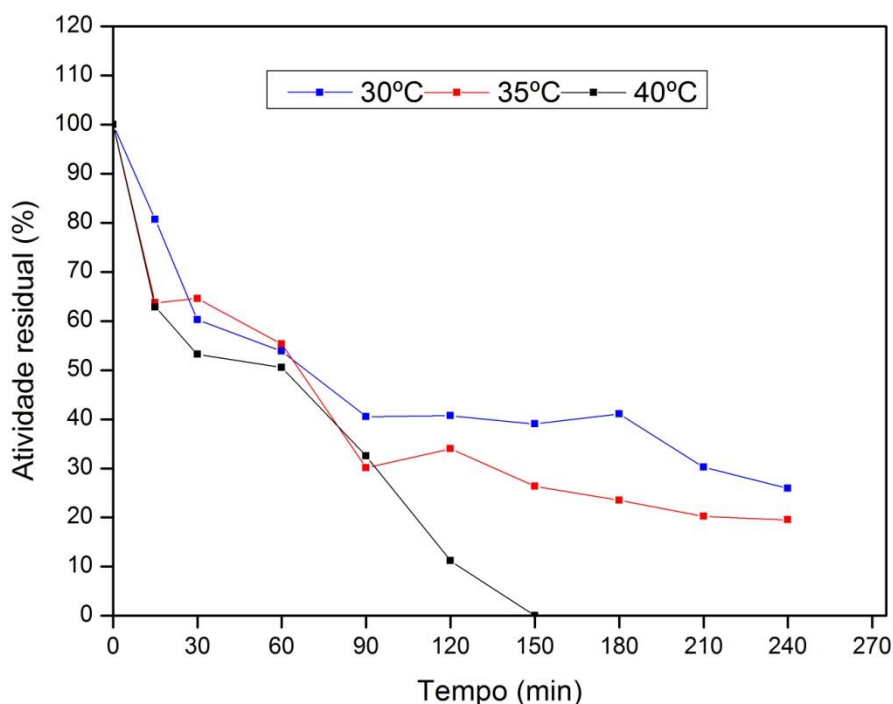


Gráfico 4 - Estabilidade da enzima frente a temperatura

Na condição experimental de pré-incubação a 40°C, o extrato enzimático apresentou aproximadamente 53% de sua atividade inicial em 30 min, sendo verificado, portanto, um decréscimo de 47% de sua atividade inicial. Em 60 min de pré-incubação, foi observado redução de aproximadamente 50% da atividade

lipolítica, apresentando meia vida ($T_{1/2}$) de 60 min. Já, após 60 min ocorreu um decréscimo acentuado da atividade enzimática, sendo verificada redução de 89% em 120 min de incubação.

Na condição de pré-incubação do extrato enzimático a 35 °C a enzima demonstrou atividade residual de 64% em 30 min e de 55% em 60 min. O extrato bruto apresentou uma maior estabilidade térmica nos diferentes tempos de incubação a 35°C, quando comparada a temperatura de incubação de 40°C. Em 240 min foi verificada uma atividade residual de 20% em 35°C, enquanto que na temperatura de 40°C já não foi mais verificada atividade residual em 150 min.

Na condição de pré-incubação a 30°C, em 60 min o extrato enzimático apresentou aproximadamente 45% de sua atividade e exibindo 25% de atividade residual em 240 min.

A enzima produzida pelo isolado fúngico não pode ser considerada termoestável, visto que sua estabilidade é fortemente afetada pela temperatura.

Lipases microbianas com maior estabilidade térmica também são verificadas. Singh et al., (2014) descreveram lipase produzida pelo fungo *Schizophyllum commune* com atividade residual de 90% após 5h de incubação em temperaturas de 50°C e 60°C. No entanto, de acordo com Lima et al., (2004) algumas lipases podem apresentar estabilidade a temperaturas mais elevadas, mas, em geral lipases fúngicas não são estáveis em temperaturas superiores a 40°C.

5.5.2 Efeito do pH e estabilidade da enzima em diferentes valores de pH

Os resultados do efeito do pH sobre a atividade lipolítica do extrato bruto estão ilustrados no gráfico 5.

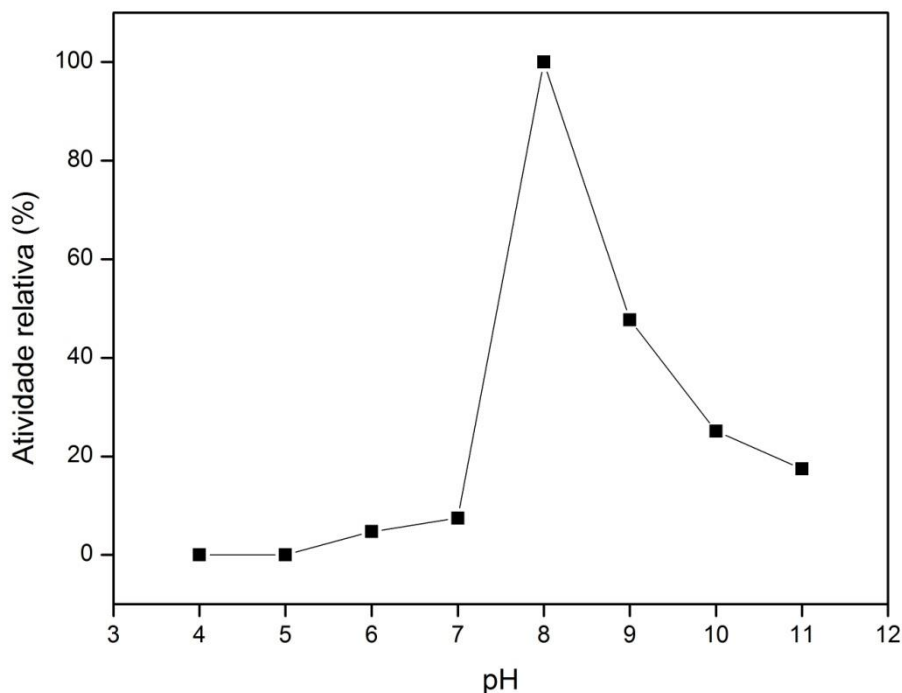


Gráfico 5 - Efeito do pH sobre a atividade lipolítica

A lipase obtida apresentou atividade na faixa de pH entre 6 e 11, exibindo pH 8 como ótimo. A atividade da enzima foi fortemente reduzida em condições de pH neutro ou ácido, bem como em pH superiores a 8. Alguns estudos descritos na literatura mostram lipases com perfil de pH ótimo alcalino. No estudo de Liu; Lu; Chang, (2006), é demonstrado pH 9 como ótimo em lipase produzida pela bactéria *Burkholderia sp.* Singh et al., (2014), verificaram melhores atividades de lipase produzida pelo fungo *Schizophyllum commune* nas faixas de pH entre 7 e 12, sendo observado pH 11 como ótimo. Diferentemente, no estudo de Torres et al., (2015) é descrito atividade de uma lipase produzida pela bactéria láctica *Lactobacillus plantarum*, entre os valores de pH 3 e 9 e com máxima atividade em pH 7,0.

Os resultados de atividade residual referente a estabilidade da enzima estão ilustrados no gráfico 6.

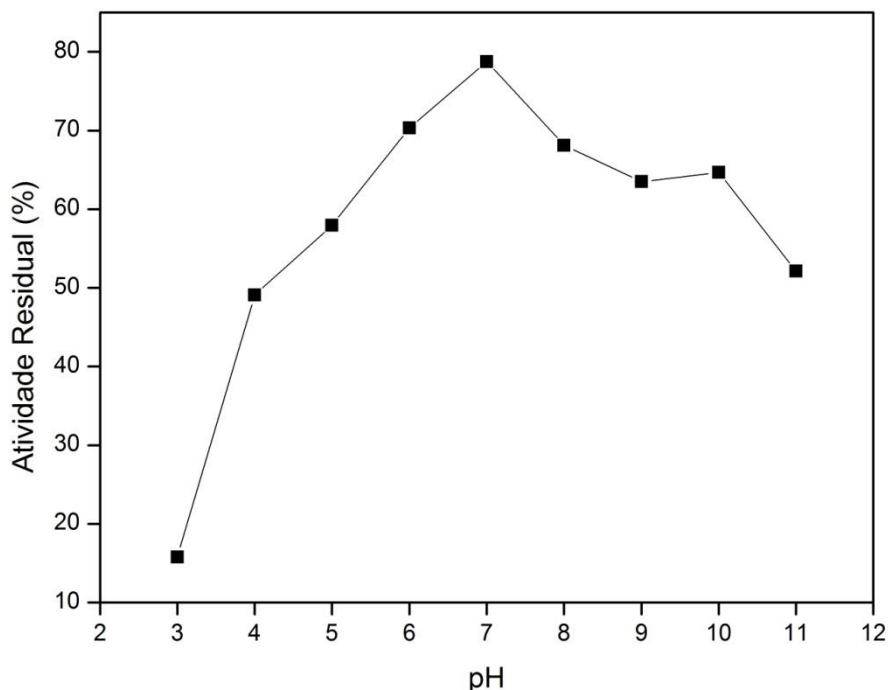


Gráfico 6 - Estabilidade da enzima frente ao pH

O extrato enzimático apresentou atividade em todos os valores de pH analisados, apenas no pH 3 a enzima apresentou menor atividade, retendo apenas 15% da atividade residual. Contudo, entre os valores de pH 7 e 10 a enzima apresentou mais de 60% de atividade residual. Valores semelhantes foram descritos no trabalho de Kasana; Kaur; Yadav, (2008), os quais verificaram estabilidade na faixa de pH de 6 a 10 de uma lipase produzida pela bactéria *Acinetobacter sp.*, com retenção de 50% de atividade residual. Perfil de lipase alcalina também é relatado por Navarro et al., (2011), onde a enzima apresentou estabilidade entre os valores de pH 7,7 a 9,0. Tal enzima foi produzida por microrganismos presentes em água residuais em fermentação sólida a partir de resíduo oriundo de indústria de refino de óleo.

Alta atividade e estabilidade de lipases em maiores valores de pH, favorecem a sua aplicação em processos industriais que demandam condições alcalinas, como por exemplo, na síntese de biopolímeros, produção de cosméticos, fármacos, biodiesel e detergentes (SINGH et al., 2014).

5.5.3 Estabilidade frente a íons metálicos

Os dados referentes ao efeito de diferentes íons sobre a atividade lipolítica do extrato bruto estão descritos na tabela 7 e gráfico 7.

Tabela 7 – Efeito de diferentes íons na atividade lipolítica

| Íons metálicos | Concentração (mM) | |
|------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 2mM (%) | 10 mM (%) |
| Padrão | 100 ^{c,d} | 100 ^{c,d} |
| Co ²⁺ | 77,03 ^e | 77,03 ^{l,g} |
| Cu ²⁺ | 108,26 ^{c,d} | 15,83 ⁱ |
| Ni ²⁺ | 64,88 ^t | 7,99 ^{l,j} |
| Fe ²⁺ | 0,00 ^g | 0,00 ^g |
| Ca ²⁺ | 111,32 ^{b,c} | 68,12 ^{e,f} |
| K ⁺ | 105,33 ^{c,d} | 122,56 ^{a,b} |
| Zn ²⁺ | 51,35 ^g | 28,75 ^h |
| I ⁻ | 97,48 ^d | 130,39 ^a |

Letras iguais denotam que não há diferença estatística significativa, letras diferentes denotam que há diferença estatística entre as espécies químicas analisadas ($p < 0,05$).

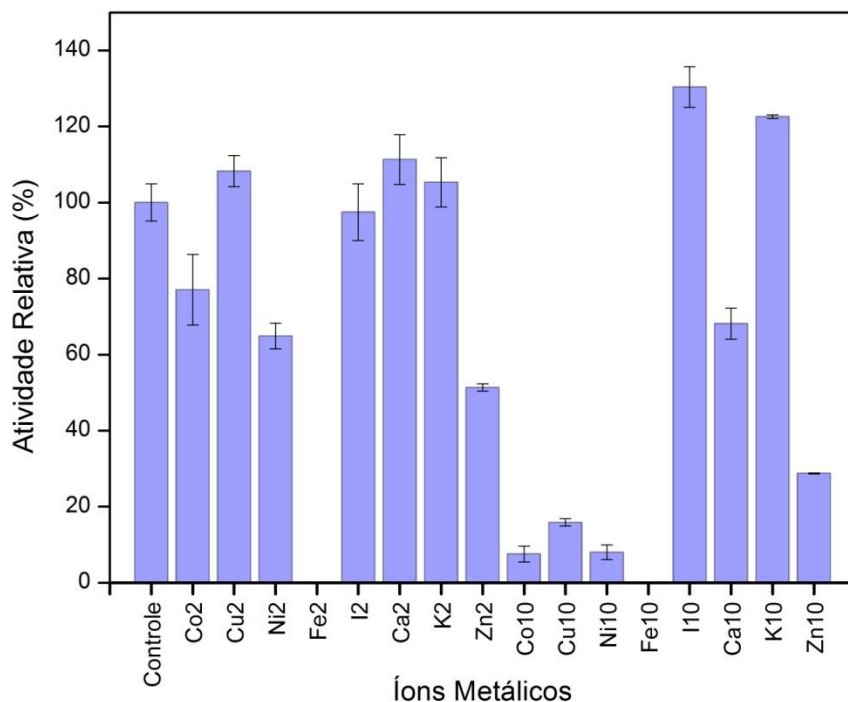


Gráfico 7 - Representação gráfica dos efeitos dos íons metálicos sobre a atividade lipolítica. Os números após cada elemento indicam a concentração molar da solução de íons (mM).

A partir dos dados descritos na tabela 7 e no gráfico 7, é possível observar uma ativação enzimática mais pronunciada na presença dos íons Cu^{2+} , Ca^{2+} e K^{+} na concentração de 2 mM, bem como de I^{-} e K^{+} na concentração de 10 mM. De maneira similar, a ativação da enzima (125%) por Ca^{2+} também foi verificada por Ramani et al., (2010) em lipase purificada de *Pseudomonas gessardii*. Ativação pelo íon Ca^{+2} (105%), também foi descrita por Sztajer et al., (1992) em lipase purificada produzida pelo fungo *Penicillium simplicissimum*.

Sun; Xu, (2009) descrevem o íon K^{+} como um agente ativador de lipase produzida pelo fungo filamentosso *Rhizopuz chinensis*. A atividade relativa verificada pelos autores é de aproximadamente 122,0%, valor semelhante ao encontrado no presente trabalho (122,5%).

Alguns dos íons testados causaram diminuição da atividade lipolítica, o que os caracteriza como íons inibidores. Maior inibição é observada pelos íons Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} (10mM), sendo totalmente inibida pelo íon Fe^{2+} nas concentrações

2mM e 10mM. Demir; Tükel, (2010) verificaram forte inibição do íon Fe^{2+} sobre a atividade lipolítica de lipase produzida pela cianobactéria *Spirulina platensis*. Similarmente, os autores Bose; Keharia, (2013) descreveram uma lipase tolerante a solventes orgânicos que foi fortemente inibida pelo íon Fe^{2+} .

A mudança da atividade lipolítica relativa (ativação ou inibição) frente a íons inorgânicos pode ser justificada pelo fato de que tais íons geralmente formam complexos com os ácidos gráxos, 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 (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009, LI; ZONG, 2010).

5.5.4 Estabilidade frente a solventes orgânicos

Solventes orgânicos foram testados para avaliar seu efeito na atividade lipolítica. Os resultados para a atividade lipolítica relativa estão expressos na tabela 8 e gráfico 8.

Tabela 8 – Efeito de diferentes solventes orgânicos sobre a atividade lipolítica

| Solventes orgânicos | Concentração | |
|---------------------|---------------------|----------------------|
| | 1% (v/v) | 10% (v/v) |
| Padrão | 100 ^a | 100 ^a |
| Hexano | 107,17 ^a | 26,07 ^f |
| Metanol | 40,67 ^d | 81,35 ^b |
| Acetona | 46,93 ^d | 76,77 ^{c,b} |
| Propanol | 50,58 ^d | 70,40 ^{c,d} |
| DMSO | 65,97 ^c | 95,43 ^a |

Letras iguais denotam que não há diferença estatística significativa, letras diferentes denotam que há diferença estatística entre as espécies químicas analisadas ($p < 0,05$).

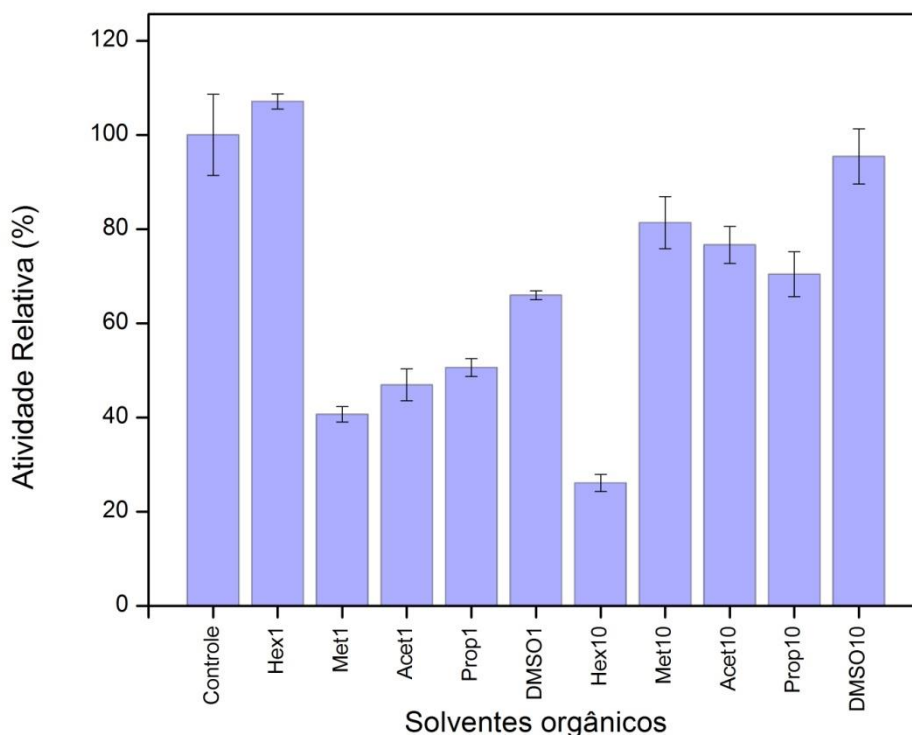


Gráfico 8 – Representação gráfica do efeito de solventes orgânicos sobre a atividade lipolítica. Os números em cada solvente representam a concentração (% v/v) do solvente no meio.

A sensibilidade da enzima na presença de solventes orgânicos foi observado na maioria dos solventes testados. Diminuição na atividade lipolítica foi verificada nos ensaios com os solventes metanol, acetona, propanol e DMSO tanto nas concentrações de 1% (v/v) e 10% (v/v). Já, ao ser incubada com hexano, é observada maior atividade lipolítica (107%) na concentração de 1% do solvente.

Demir; Tükel, (2010) descreveram uma lipase que apresentou instabilidade frente aos solventes hexano (44% de atividade relativa), metanol (72%), isopropanol (89%) e acetona (11%). Igualmente, pode ser verificado no estudo de Daoud et al., (2013) a sensibilidade da enzima frente aos solventes metanol (3%), propanol (62%) e acetona (23%).

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 de solventes orgânicos. No entanto, se as enzimas forem naturalmente estáveis e apresentarem uma atividade

significativa na presença de solventes, as mesmas se tornam necessárias para certos ramos 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).

A ativação da lipase pode ser explicada pela interação dos solventes orgânicos com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes na tampa que cobre o sítio catalítico da enzima, mantendo assim, a lipase em sua conformação aberta (PATEL; NAMBIAR; MADAMWAR, 2014).

A inativação da enzima frente a solventes orgânicos ocorre devido a mudanças reversíveis na estrutura da proteína ou inativação irreversível devido à incubação prolongada da enzima (ABDULLA; RAVINDRA, 2013).

6 CONCLUSÃO

Foram selecionadas cepas selvagens de fungos filamentosos produtores de lipases extracelulares, as quais demonstraram potencial lipolítico em fermentações sólidas em meio à base de farelo de soja ou *okara* sem suplementação nutricional.

Os dados de caracterização físico-química (composição proximal) e aspectos morfológicos avaliados por MEV (partículas com pequenas dimensões e irregulares) indicam o farelo de soja e o *okara* como potenciais substratos para produção de lipases extracelulares.

O farelo de soja demonstrou maior potencial como substrato para produção de lipases extracelulares em fermentação sólida quando comparado com o *okara* em condições de cultivo sem suplementação nutricional.

O isolado S4, *Penicillium sp.* apresentou maior potencial lipolítico entre os fungos estudados quando empregado farelo de soja como substrato.

Os resultados do planejamento experimental indicaram que maiores atividades lipolíticas são obtidas quando empregando concentração de conídeos (10^4 esporos / mL) e umidade (54 %) no nível -1 dentro da faixa de estudo do delineamento. A variável independente tempo de cultivo não apresentou efeito linear ou quadrático significativo ao nível de 95% de confiança.

O extrato enzimático obtido pelas fermentações apresentou temperatura ótima de atividade lipolítica de 35°C e pH ótimo de 8.

Maior estabilidade enzimática foi verificada em condições alcalinas. Os íons Ca^{2+} , K^{2+} , Cu^{2+} (2 mM) e I^- apresentaram efeito ativador sobre a atividade lipolítica da lipase, diferentemente do íon Fe^{2+} , que apresentou forte inibição.

A lipase obtida apresentou sensibilidade quando na presença da maioria dos solventes orgânicos testados, com exceção do solvente hexano, que apresentou efeito ativador.

Os valores de atividade lipolítica obtidos no presente trabalho sugerem a necessidade de suplementação nutricional do farelo de soja para obtenção de maiores atividades de lipase pelos fungos estudados.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Houria; HIOL, Abel; DEYRIS, Valerie; COMEAU, Louis. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor sp.* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 968–975, 2002.

ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. Characterization of cross linked *Burkholderia cepacia* lipase in alginate and carrageenan hybrid matrix. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 4, p. 545–551, 2013

ABIOVE - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS.
Disponível em:
<<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica&area=NC0yLTE=>>.
Acesso em 01 de maio de 2015.

ANDALUEMA, Berhanu; GESSESSE, Amare. Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review. **Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 100 -118, 2012.

AOAC-Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 18th ed. Washington: AOAC, 2007.

APARICIO, Mateos; PEINADO, Mateos; RUPÉREZ, Jiménez. Multifuncional antioxidant activity of polysaccharide fractions from the soybean by product *okara*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 245-250, 2010.

GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 175–185, 2012.

BARBOSA, Luiz C. A.; **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**, 1 ed, Viçosa: Ed. UFV, 2008.

BAÚ, Tahis R.; Cunha, Mário A. A.; CELLA, Sibila M.; OLIVEIRA, Amanda L. J.; ANDRADE, Jéssica T. Barra alimentícia com elevado valor proteico: formulação, caracterização e avaliação sensorial. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 4, n. 1, p. 42 – 51, 2010.

BOSE, A.; KEHARIA, H. Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 255–266, 2013.

BOWLES, Simone; DEMIATE, Ivo M.; Caracterização físico-química de *Okara* e aplicação em pães do tipo francês. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 652-659, 2006.

CAMPBELL, Mary K. **Bioquímica**, 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

CARVALHO, Patrícia de O.; CAMPOS, Paula R. B.; NOFFS, Maximiliano D.; OLIVEIRA, Joaquim G.; SHIMIZU, Mário T.; SILVA, Daniela M. Aplicações de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75 – 80, 2003.

CASTRO, Ruan J. S.; SATO, Hélia H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical–chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2013.

CHANTASARTRASAMEE, Kwankira; AYUTHAYA, Duangnetre I.; INTARAREUGSORN, Suthum; DHARMSTHITI, Saovanee. Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 2285-2289, 2005.

CHISTÉ, Renan C.; COHEN, Kelly O.; MATHIAS, Erla A.; RAMOA, A. G. A. Qualidade da farinha de mandioca do grupo seca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 861–864, 2006.

COLLA, Luciane M.; REINEHR, Christian O.; COSTA, Jorge A. V.; Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC**, v. 4, n. 2, p. 1 – 14, 2012.

CUENCA, A.; SUÁREZ, M. J.; APARICIO, I. Soybean seeds and its by-product *okara* as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1099–1105, 2008.

CUNHA, Mário A. A.; ANDRADE, Aline C. W.; FERMIANI, Eliane A.; APPELT, Patrícia; BURATTO, Ana P. Barras alimentícias formuladas com resíduo de soja. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 1, n. 2, p. 89-96, 2010.

DAOUD, Lobna; KAMOUN, Jannet; ALI, Madiha; JALLOULI, Raida; BRADAI, Rim; MECHICHI, Tahar; GARGOURI, Youssef; ALI, Yassine; ALOULOU, Ahmed. Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. **International journal of biological macromolecules**, v. 57, p. 232–7, jun. 2013.

DEMIR, B. S.; TÜKEL, S. S. Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, n. 3-4, p. 123–128, 2010.

DEVLIN, Thomas M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**, Blucher: São Paulo, 2011.

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 270–282, 2010.

MARTOS, I.; RUPÉREZ, P. Indigestible fraction of okara from soybean: composition, physicochemical properties and in vitro fermentability by pure cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 5, p. 685–693, 2008.

FERRAREZI, Ana L.; HIDEYUKI, Thiago; BORGES, Janaina P.; BRITO, Rafaela R.; SIQUEIRA, Marcos R.; VENDRAMINI, Pedro H.; QUILLES, José C.; DA COSTA Nunes, C.; BONILLA-RODRIGUEZ, Gustavo O.; BOSCOLO, MAURICIO; SILVA, Roberto; GOMES, Eleni. Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic *Thermomucor indicae seudaticae* N31 for transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 106–113, 2014.

FERRAZ, Lenir R.; DE OLIVEIRA, Daniela S.; SILVA, Marcell F.; RIGO, Elisandra.; DI LUCCIO, Marco.; OLIVEIRA, Vladimir J.; OLIVEIRA, Débora; TREICHEL, Helen. 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, n. 3, p. 243-252, 2012.

GRIESHOP, C. M.; FAHEY, G. C. Comparison of Quality Characteristics of Soybeans from Brazil, China, and the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2669–2673, 2001.

GUPTA, Namita; RATHI, Pooja; GUPTA, Rani. Simplified *para*-nitrophenil palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**, v. 311, p. 98-99, 2002.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 6, p. 782–98, 2009.

HASAN, Fariha. SHAH, Aamer A.; HAMEED, Abdul. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235 – 251, 2006.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation--are there any biotechnological advantages? **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–6, 2005.

HSIEH, C. Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 1, p. 105–109, 2004.

IMANDI, S. B.; KARANAM, S. K.; GARAPATI, H. R. Use of Plackett-Burman design for rapid screening of nitrogen and carbon sources for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from mustard oil cake (*Brassica napus*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 915–921, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. EPU: São Paulo, 2008. v. 1.

JAEGER, Karl E.; REETZ, Manfred T.; Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Tibtech**, v. 16, 1998.

JANKOWIAK, Lena; TRIFUNOVIC, Olivera; BOOM, Remko M.; VAN DER GOOT, Atze J. The potential of crude okara for isoflavone production. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 166–172, 2014.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228–240, 2013.

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

KASANA, R. C.; KAUR, B.; YADAV, S. K. Isolation and identification of a psychrotrophic *Acinetobacter sp.* CR9 and characterization of its alkaline lipase. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 207–212, 2008.

KHARE, S. K.; JHA, K. GANDHI, A. P.B; Citric acid production from *Okara* (soy-residue) by solid-state fermentation. **Biosource Technology**, v. 54, n. 3, p. 323-325, 1995.

KUMAR, Sunil; KATIYAR, Nitin; INGLE, Priyanka; NEGI, Sangeeta. Use of evolutionary operation (EVOP) factorial design technique to develop a bioprocess using grease waste as a substrate for lipase production. **Bioresource technology**, v. 102, n. 7, p. 4909–12, 2011.

LI, Bo; QIAO, Meiyng; LU, Fei. Composition, Nutrition, and Utilization of Okara (Soybean Residue). **Food Reviews International**, v. 28, n. 3, p. 231–252, 2012.

LI, N.; ZONG, M. H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 43–54, 2010.

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, n. 1, p. 65–71, 2004.

LIU, C. H.; LU, W. B.; CHANG, J. S. Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1940–1944, 2006.

LU, Fei; LIU, Yang; LI, BO. Okara dietary fiber and hypoglycemic effect of *okara* foods. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 2, p. 126-132, 2013.

LUZ, Gianini R.; SOUZA, Luiza H. C. D.; JORGE, Luiz M. M.; PARAÍSO, Paulo R. Estudo das isotermas de equilíbrio do farelo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 408-413, 2006.

MADRONA, Grasiela. S.; ALMEIDA, Aline. M. Elaboração de biscoitos tipo cookie à base de *okara* e aveia. **Revista Tecnológica**, v. 17, p. 61-72, 2008

MARTOS, Irene E.; RUPÉREZ, P.; Indigestible fraction of okara from soybean: composition, physicochemical properties and in vitro fermentability by pure cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. **Eur Food Res Technology**, v. 228, p. 685-693, 2009.

MENDES, Adriano A.; OLIVEIRA, Pedro C.; CASTRO, Heizir F.; Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119-134, 2012.

MENONCIN, Silvana; DOMINGUES, Natália M.; FREIRE, Denise M. G.; TONIAZZO, Geciane; CANSIAN, Rogério L.; OLIVEIRA, Vladimir J.; DI LUCCIO, Marco; DE OLIVEIRA, Débora; TREICHEL, Helen. Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran. **Food Bioprocess Technology**, v.3, p. 537-544, 2010.

MESSIAS, Josana M.; COSTA, Bruna Z.; LIMA, Valéria M. G.; GIESE, Ellen C.; DEKKER, Robert F. H.; BARBOSA, Aneli M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213–234, 2011.

MONTEIRO, Valdirene N.; SILVA, Roberto N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Aplicada. **Revista Processos Químicos**. 2009. Disponível em: <http://www.rpqsenai.org.br/index.php?option=com_k2&view=item&task=download&id=44_73664fb233c5741b231d1801285a8544>. Acesso em: 12 set. 2013.

NELSON, David L.; COX, Michael M.; **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NAVARRO, Angélica; GEA, Teresa; BARRENA, Raquel; SÁNCHEZ, Antoni. Production of lipases by solid state fermentation using vegetable oil-refining wastes. **Bioresource technology**, v. 102, n. 21, p. 10080–4, 2011.

O'TOOLE, D. K. Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production--a review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 2, p. 363–71, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153–1169, 2000.

PATEL, V.; NAMBIAR, S.; MADAMWAR, D. An extracellular solvent stable alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. DMVR46: Partial purification, characterization and application in non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1673–1681, 2014.

RAMANI, K.; KENNEDY, L.; RAMAKRISHNAN, M.; SEKARAN, G. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 10, p. 1683–1691, 2010.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: a review. **Advances in colloid and interface science**, v. 147-148, p. 237–50, 2009.

REKHA, C. R.; VIJAYALAKSHMI, G. Accelerated fermentation of “idli” batter using soy residue okara. **Journal of food science and technology**, v. 48, n. 3, p. 329–34, 2011.

RIEGER, Clovis; DE OLIVEIRA, Vladimir; LOVATTO, Paulo A.; ARAÚJO, Jocélio S.; PEIXOTO, Érika C. M.; DA SILVA, Marcelo A. Características químicas e valores energéticos de farelo de soja do oeste e sudoeste do Paraná. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 266-269, 2008.

RIGO, Elisandra; NINOW, Jorge L.; DI LUCCIO, Marco; OLIVEIRA, Vladimir J.; POLLONI, André E.; REMONATTO, Daniela; ARBTER, Francieli; VARDANEGA, Renata; OLIVEIRA, Débora; THEICHEL, Helen. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LTW – Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1132-1137, 2010.

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

SALIHU, Aliyu; ALAM, Zahangir M.; ABDULKARIM, Ismail M.; SALLEH, Hamzah M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36 – 44, 2012.

SÁNCHEZ, Carmen. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 185–94, 2009.

SANTOS, Kádima C.; CASSIMIRO, Débora M. J.; AVELAR, Matheus H. M.; HIRATA, Daniela B.; DE CASTRO, Heizir F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; MENDES, Adriano A. Characterization of the catalytic properties of lipase from plant seed for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, v. 14, p. 462-470, 2013.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, Anita; GIRI, Bhoopander; DAVIDSON, Sheba. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 239–247, 2003.

SETH, Sonali; CHAKRAVORTY, Debamitra; PATRA, Sanjukta. An insight into plant lipase research – challenges encountered. **Protein Expression & Purification**, v. 95, p. 13-21, 2014.

SEIBEL, Neusa F.; BELÉIA, Adelaide. Características químicas e funcionalidade tecnológica de ingredientes de soja [*Glycine Max* (L.) Merrill]: carboidratos e proteínas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 2, p. 113–122, 2009.

SHARMA, Rohit; CHISTI, Yusuf; BANERJEE, Uttam C.; Production, purification, characterization and application of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627 - 662, 2001.

SILVA, Fernanda R. G. B.; SOUZA, Marcos; DA COSTA, Alexandre M. S.; JORGE, Luiz M. M.; PARAÍSO, Paulo R. Experimental and numerical analysis of soybean meal drying in fluidized bed. **Powder Technology**, v. 229, p. 61-70, 2012.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. April 2011, p. 486–520, 2012.

SINGH, Sawraj; BANERJEE, U. C.; Purification and characterization of *trans*-3-(4-methoxyphenyl) glycidic acid methyl ester hydrolyzing lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1063-1068, 2007.

SINGH, Manoj K.; SINGH, Jyoti; KUMAR, MADAN; THAKUR, Indu S. Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 110, p. 92–99, 2014.

SINGHANIA, Reeta R.; PATEL, Anil K.; SOCCOL, Carlos R.; PANDEY, Ashok. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.

SLIVINSKY, Christiane T.; MALLMANN, Edgar; ARAÚJO, Janete M.; MITCHELL, David A.; KRIEGER, Nadia. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. **Process Biochemistry**, v 47, n 12, p. 1848-1855, 2012.

STERGIOU, Panagiota Y.; FOUKIS, Athanasios; FILIPPOU, Michalis; KOUKORITAKI, Maria; PARAPOULI, Maria; THEODOROU, Leonidas G.; HATZILOUKAS, Efstathios; AFENDRA, Amalia; PANDEY, Ashok; PAPAMICHAEL, Emmanuel M. Advances in lipase-catalysed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1846 – 1859, 2013.

SUN, S. Y.; XU, Y. Membrane-bound “synthetic lipase” specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: a comparative investigation. **Bioresource technology**, v. 100, n. 3, p. 1336–42, 2009.

SZTAJER, HELENA; LÜNSDORF, HEINRICH; ERDMANN, HELMUT; MENGE, ULRICH; SCHMID, ROLF. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1124, n. 3, p. 253–261, 1992.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, 2013.

TORRES, María; MANCHEÑO, José M.; RIVAS, Blanca; MUÑOZ, Rosario. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 246–252, 2015.

VALERA, H. R.; GOMES, J.; LAKSHMI, S.; GURURAJA, R.; SURYNARAYAN, S.; KUMAR, D. Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 5, p. 521-526, 2005.

VARGAS, Gean D. L. P.; TREICHEL, Helen; OLIVEIRA, Debora; BENETI, C.; FREIRE, Denise M.; LUCCIO, Marco. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 54, n. May 2007, p. 47–54, 2008.

VAZ, Madalena; CHOUPINA, Altino. Lipases: Biocatalizadores da Hidrólise de Triacilglicerois. **Revista eletrônica de biologia**, v. 5, n. 3, p. 42 – 58, 2012.

VOGEL, H. J. A convenient growth médium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42-47, 1956.

WACHIRAPHANSKUL, S.; DEVAHASTIN, S. Drying kinetics and quality of okara dried in a jet spouted bed of sorbent particles. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 207–219, 2007.

WANG, Jianlei; LIU, Zhemin; WANG, Yue; CHENG, Wen; MOU, Haijin. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils.

Biochemical Engineering Journal, v. 40, n. 3, p. 445–451, 2008.

WOLSKI, Elisangela; MENUSI, Elisangele; REMONATTO, Daniela; VARDANEGA, Renata; ARBTER, Francieli; RIGO, Elisandra; NINOW, Jorge; MAZUTTI, Márcio A.; DI LUCCIO, Marco; DE OLIVEIRA, Débora; TREICHEL, Helen. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: A comparative study. **LTW**, v. 42, p. 1557-1560, 2009.