

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA TAYNARA CARDOSO DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO
UTILIZANDO MEIOS DE BAIXO CUSTO**

APUCARANA

2021

CAMILA TAYNARA CARDOSO DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO
UTILIZANDO MEIOS DE BAIXO CUSTO**

**Production of lipases by fermentation in the solid state
using low cost means**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Licenciado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Profa. Dra. Alessandra Machado Baron.

APUCARANA

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

CAMILA TAYNARA CARDOSO DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO
UTILIZANDO MEIOS DE BAIXO CUSTO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Licenciado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 03 de dezembro de 2021

Milena Martins Andrade
Doutorado em Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campus Apucarana
(Banca Examinadora)

Patrícia Salomão Garcia
Doutorado em Ciência de Alimentos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campus Apucarana
(Banca Examinadora)

Alessandra Machado Baron
Doutorado em Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campus Apucarana
(Orientadora)

APUCARANA

2021

Aos meus pais, José e Viviane,
ao meu irmão Caio,
a minha avó Maristela,
aos meus tios Marcos e Fábio (*in memoriam*).
Pessoas que sempre estiveram presentes em minha
vida, incentivando, contribuindo e celebrando meus
estudos e conquistas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e por ser meu guia;

À minha família, pelo carinho, incentivo e paciência, responsáveis pela minha formação;

À orientadora Alessandra (mãe científica), pelos ensinamentos, apoio, disponibilidade e parceria;

Aos professores que fizeram parte da minha graduação, em especial a Patrícia e Milena, por aceitarem fazer parte da banca;

Aos colegas de laboratório, que auxiliaram para a realização desta pesquisa;

À Caramuru Alimentos[®], pela doação da torta de milho;

À UTFPR, em especial ao Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa do Campus Apucarana (Lamap), pela utilização dos seguintes equipamentos: espectrofotômetro de absorção UV-Vis (Cary 60, Agilent) e liofilizador (SL-404, Solab);

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação.

Pois o que o Senhor abençoa, abençoado está
para sempre.
(1 Crônicas 17:27)

RESUMO

As lipases são biocatalisadoras aplicáveis em diversas reações, e assim atraentes para usos industriais. Devido seu potencial biotecnológico, a otimização de processos de produção vem sendo estudado. Atualmente, a produção destas enzimas envolve a fermentação submersa (FS) e a fermentação no estado sólido (FES). Ao serem comparadas, a FES possui vantagens como, a simplicidade do meio, visto que o Brasil possui abundância de biomassa e resíduos agroindustriais, simulação do habitat natural dos microrganismos e menor custo de produção. Sua utilização resulta em produtos com valor agregado, acarretando a redução de custos e diminuição de problemas ambientais. O presente trabalho tem por objetivo o estudo da produção de lipases de *Penicillium corylophilum* por fermentação no estado sólido (FES), utilizando diferentes meios de cultivo: farelo de semente de girassol (FSG), torta de milho (TM) e trigoilho (T). Para tal, foram determinadas as umidades dos meios de cultivo em analisador de umidade com lâmpada de infravermelho, estudou-se a solução umidificadora, água e tampão fosfato pH 7, 0,05 mol L⁻¹, fixando a umidade final em 55% (v/m), o efeito da liofilização na atividade enzimática do sólido fermentado e uma análise dos custos para a produção das lipases de *P. corylophilum* por FES para os meios citados. A produção de lipases foi analisada pela atividade lipolítica mediante o método da hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP). Para o meio com maior atividade, a atividade foi avaliada também pelo método titulométrico, utilizando o óleo de oliva. Os resultados mostraram que a quantidade de água para alcançar a umidade de 55%, varia para cada substrato, sendo maior para T (3 mL de água/ g de substrato) e menor para FSG (2,4 mL de água/ g de substrato). O trigoilho (T) apresentou a maior atividade lipolítica, 32,3 U g⁻¹ S em 168 horas de cultura. A dosagem da atividade lipolítica pelo método titulométrico indicou a presença de lipases “verdadeira” e a atividade foi 97 ± 11,9 U g⁻¹ S. Em relação à liofilização, a atividade residual foi maior para FSG (83%) e muito próximas para T (38%) e TM (40%). A análise de custos indicou valores muito próximos para os três meios, sendo o menor para TM (R\$ 73,99/ 100 g de substrato seco) seguido do T (R\$ 74,49/ 100 g de substrato seco) e FSG (R\$ 75,41/ 100 g de substrato seco). Sendo assim, analisando os resultados de custo e perdas na atividade durante a liofilização, o trigoilho seria mais viável quando se pretende utilizá-lo sem a necessidade de liofilização, isto é, aplicação essencialmente em reações onde o meio aquoso é principal, pois apresentou maior atividade lipolítica e o segundo menor valor (R\$ 74,49/ 100 g de substrato seco). Porém, para reações onde há necessidade de se utilizar um fermentado com baixos teores de água, por exemplo, em reações de esterificação, o FSG seria mais viável, pois o sólido fermentado apresentou menor perda da atividade após a liofilização.

Palavras-chave: resíduos agroindustriais; fungo; lipase; *Penicillium corylophilum*.

ABSTRACT

Lipases are biocatalysts applicable in various reactions, and thus attractive for industrial uses. Due to its biotechnological potential, the optimization of production processes has been studied. Currently, the production of these enzymes involves submerged fermentation (FS) and solid state fermentation (FES). When compared, FES has advantages such as the simplicity of the environment, as Brazil has an abundance of biomass and agro-industrial residues, simulation of the natural habitat of microorganisms and lower production cost. Its use results in products with added value, reducing costs and reducing environmental problems. The present work aims to study the production of lipases from *Penicillium corylophilum* by solid state fermentation (FES), using different culture media: sunflower seed meal (FSG), corn cake (TM) and cornmeal (T). To this end, the moistures of the culture media were determined in a moisture analyzer with an infrared lamp, the humidifying solution, water and phosphate buffer pH 7, 0.05 mol L⁻¹ were studied, setting the final moisture at 55 % (v/m), the effect of lyophilization on the enzymatic activity of the fermented solid and an analysis of the costs for the production of *P. corylophilum* lipases by FES for the aforementioned media. The production of lipases was analyzed by lipolytic activity using the hydrolysis method of p-nitrophenyl palmitate (pNPP). For the medium with higher activity, the activity was also evaluated by the titrimetric method, using olive oil. The results showed that the amount of water to reach a moisture content of 55% varies for each substrate, being higher for T (3 mL of water/g of substrate) and lower for FSG (2.4 mL of water/g of substrate). Wheatear (T) had the highest lipolytic activity, 32.3 U g⁻¹ S in 168 hours of culture. The measurement of lipolytic activity by the titrimetric method indicated the presence of “true” lipases and the activity was 97 ± 11.9 U g⁻¹ S. Regarding lyophilization, the residual activity was higher for FSG (83%) and very close for T (38%) and TM (40%). The cost analysis indicated very similar values for the three media, being the lowest for TM (BRL 73.99/100 g of dry substrate) followed by T (BRL 74.49/100 g of dry substrate) and FSG (BRL 75.41/100 g of dry substrate). Thus, analyzing the results of cost and activity losses during freeze-drying, wheat wheat would be more viable when one intends to use it without the need for freeze-drying, that is, application essentially in reactions where the aqueous medium is main, as showed the highest lipolytic activity and the second lowest value (R\$ 74.49/100 g of dry substrate). However, for reactions where it is necessary to use a fermented product with low water contents, for example, in esterification reactions, FSG would be more viable, as the fermented solid showed less loss of activity after freeze-drying.

Keywords: agro-industrial residues; fungus; lipase; *Penicillium corylophilum*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Principais reações catalisadas por lipases.....	15
Figura 2- Fungo <i>Penicillium corylophilum</i> em meio BDA. Crescimento após 6 dias, a 29 °C	22
Figura 3- Representação esquemática da reação de hidrólise do palmitato de <i>p</i> -nitrofenila catalisada por lipase	25
Figura 4 - Representação esquemática da reação de hidrólise pelo método titulométrico	26
Figura 5 - Substratos para a produção de lipases de <i>Penicillium corylophilum</i> por fermentação no estado sólido. TM: torta de milho; T: trigoilho; FSG: farelo de semente de girassol. À direita, os substratos antes do processo de fermentação e à esquerda, o fermentado após 6 dias de fermentação	32
Figura 6 – Atividade lipolítica relativa aos sólidos fermentados obtidos do cultivo de <i>Penicillium corylophilum</i> utilizando diferentes substratos. Condições: 55% de umidade, 29°C. Condições de ensaio na dosagem da atividade em pNPP: 40 °C, tampão fosfato pH 8,0, 0,05 mol L ⁻¹ . a,b,c: letras acima nas colunas indicam diferenças significativas segundo o teste Tukey com 95% de confiança (p ≤ 0,05).....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Determinação da quantidade de água necessária para os diferentes substratos utilizados na fermentação no estado sólido através do analisador de umidade com lâmpada infravermelha	29
Tabela 2- Quantidades de água acidionadas para umidificar os substratos utilizados na fermentação no estado sólido para produção de lipases de <i>Penicillium corylophilum</i>	29
Tabela 3- Composição físico-química dos substratos a partir de dados da literatura ou de informações do fabricante	30
Tabela 4 - Fermentação no estado sólido para produção de lipases, análise de diferentes indutores	30
Tabela 5 - Citações sobre produção de lipase por FES	34
Tabela 6 - Efeito das soluções umidificadoras sobre a produção das lipases de <i>Penicillium corylophilum</i> for fermentação no estado sólido. Condições: 55% de umidade; 144 h, 29 °C. Condições de ensaio na dosagem da atividade em pNPP: 40 °C, tampão fosfato pH 8,0, 0,05 mol L ⁻¹	35
Tabela 7 - Efeito da liofilização na atividade dos sólidos fermentados obtidos em 144 h de cultivo em meio com solução de água como umidificadora (55% de umidade). Condições de ensaio na dosagem da atividade em pNPP: 40 °C, tampão fosfato pH 8,0, 0,05 mol L ⁻¹	36
Tabela 8 - Valores em reais para a produção de lipases de <i>Penicillium corylophilum</i> em diferentes meios de cultivo em fermentação no estado sólido	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FES	Fermentação no estado sólido
FS	Fermentação submersa
FSG	Farelo de semente de girassol
<i>p</i> NPP	Palmitato de <i>p</i> -nitrofenila
RM	Razão molar
SS	Substrato seco
T	Triguilho
TM	Torta de milho
U g ⁻¹ SS	Unidades de atividade enzimática por grama de substrato seco
U g ⁻¹ S	Unidades de atividade enzimática por grama de sólido fermentado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos gerais	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 Lipases	15
3.1.1 Lipase de <i>Penicillium corylophilum</i>	16
3.2 Fermentação no estado sólido	18
3.2.1 Substratos	19
4 METODOLOGIA	21
4.1 Reagentes.....	21
4.2 Microrganismo	21
4.3 Esterilização dos meios	21
4.4 Preservação da cepa	21
4.5 Composição dos meios e preparação dos substratos.....	22
4.6 Condições de cultivo.....	22
4.6.1 Determinação da umidade por infravermelho	23
4.6.2 Estudo da solução umidificadora.....	23
4.6.3 Estabilidade à liofilização	23
4.8 Custo-benefício.....	24
4.9 Métodos analíticos.....	24
4.9.1 Determinação da atividade lipolítica.....	24
4.9.1.1 Método de hidrólise do palmitato de <i>p</i> -nitrofenila	24
4.9.1.2 Método titulométrico	26
4.10 Análise estatística através do teste de Tukey.....	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Determinação da umidade com lâmpada infravermelha	28
5.2 Fermentação no estado sólido utilizando diferentes substratos	31
5.3 Efeito das soluções umidificadoras.....	35
5.4 Efeito da liofilização dos sólidos fermentados	35
5.5 Análise do custo-benefício para fermentação no estado sólido em diferentes meios de cultivo.....	36
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

Lipases [Glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3)] são enzimas atuantes na interface orgânico-aquosa, que catalisam a clivagem de ligações éster em triglicerídeos, produzindo glicerol e ácidos graxos livres. Além disso, em meios não aquosos, agem catalisando também reações de esterificação, transesterificação, interesterificação, aminólise e lactonização, constituindo uma classe especial de esterases (BORELLI; TRONO, 2015).

As lipases oriundas de microrganismos apresentam potencial como biocatalisador, com vasta gama de aplicação industrial devido sua estabilidade, especificidade de substrato, produção em grandes quantidades e menores custos de produção (PRABANINGTYAS *et al.*, 2018), ou seja, a produção de lipases por microrganismos viabiliza a utilização de matérias-primas com baixo valor agregado.

Diferentes técnicas de produção foram desenvolvidas em busca de lipases específicas, estáveis e com maior rendimento permitindo sua aplicação industrial (SALIHU, 2012; RIGO *et al.*, 2009). Fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS) são os dois métodos de produção mais utilizados para produzir lipase fúngica (GEOFFRY; ACHUR, 2018; SUN; XU, 2008). A produção destas enzimas por FES permite a utilização de resíduos agroindustriais, reduzindo o custo de produção e contribuindo com o meio ambiente (PUTRI *et al.*, 2020).

Tendo em vista a preocupação com a diminuição de custos de produção de lipases, diferentes meios de cultivo foram estudados para produzir lipases de *Penicillium corylophilum*, através da fermentação no estado sólido (FES).

Para tal, levou-se em consideração que há poucos relatos na literatura utilizando o fungo *P. corylophilum* para produção de lipases e apenas os resultados obtidos por Camargo (2015), para a produção de lipases por FES utilizando o referido fungo. Partindo destes resultados prévios, para os estudos sobre FES desenvolvidos neste projeto, optou-se pela fixação da umidade da FES em 55%, quantidade de dias para o processo fermentativo (5, 6 e 7) e continuidade com o substrato farelo de semente de girassol (FSG). Os demais substratos, torta de milho (TM) e trigoilho (T) estão sendo utilizados pela primeira vez na produção de lipase de *P. corylophilum* por FES.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Produzir lipases de *Penicillium corylophilum* (IOC 4211) por FES.

2.2 Objetivos específicos

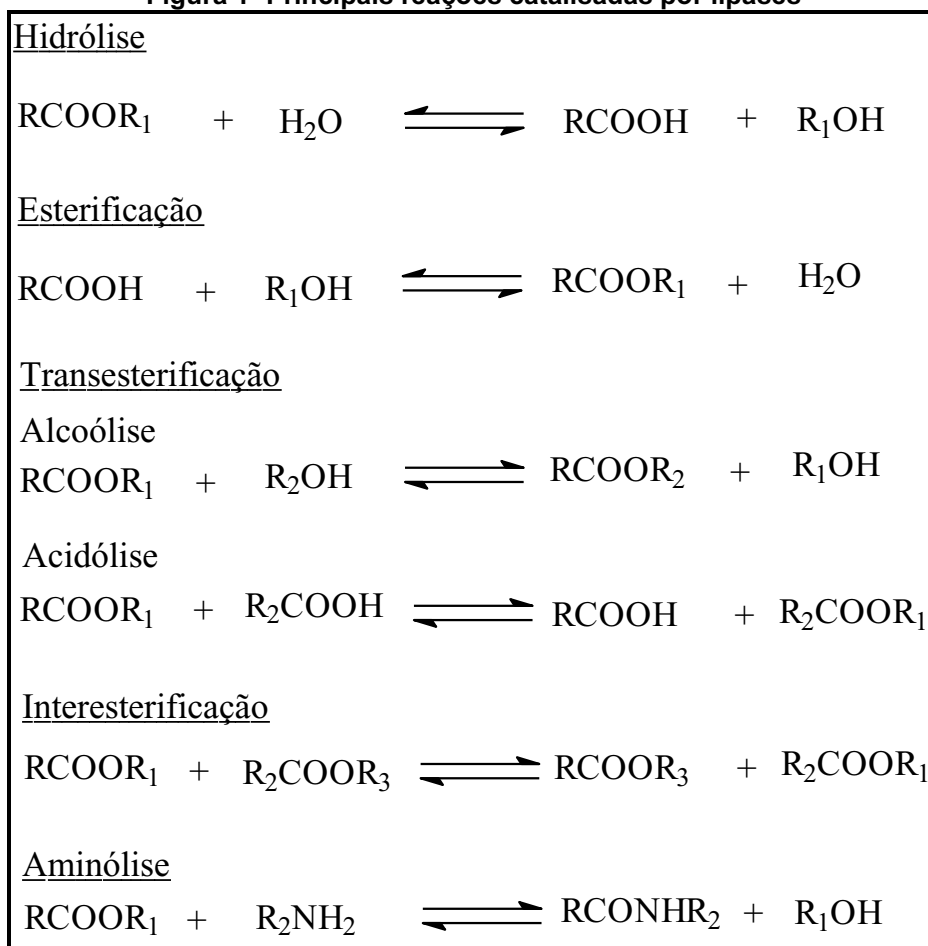
- Determinar a umidade dos meios de cultivos utilizados;
- Produzir lipases de *P. corylophilum* por FES utilizando: trigoilho, farelo de semente de girassol, torta de milho, fixando a umidade em 55%;
- Estudar as soluções para umidificar os meios de cultivo contendo: água destilada e tampão fosfato pH 7,0 0,05 mol L⁻¹;
- Estudar a influência da liofilização na atividade enzimática do sólido fermentado;
- Estimar os custos para a produção de lipases para cada meio de cultivo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Lipases

Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas usadas em diferentes setores industriais e, devido à sua versatilidade estão envolvidas em diferentes processos. Catalisam reações de hidrólise, esterificação, transesterificação, interesterificação, aminólise e lactonização, constituindo uma classe especial de esterases (BORELLI; TRONO, 2015; GARCIA *et al.*, 1999) (Figura 1).

Figura 1- Principais reações catalisadas por lipases



Fonte: Adaptado de Borrelli e Trono (2015)

O interesse na catálise enzimática está relacionado às vantagens que as enzimas possuem quando comparado aos catalisadores químicos. As aplicações de lipases incluem diversos setores, como: indústrias de alimentos, química, farmacêutica, cosméticos, biodiesel, couro, entre outras (MESSIAS *et al.*, 2011).

Entretanto, aumentar o emprego em diferentes setores industriais está relacionado à diminuição dos custos de produção. Para isso, estratégias como seleção de novos microrganismos produtores de enzimas e utilização de meios de baixo custo vem sendo estudados (REINEHR *et al.*, 2014).

Características como a possibilidade de catalisar reações em distintos meios (aquoso, orgânico, aquo-restrito), capacidade de utilização em vários substratos, estabilidade referente à temperatura, pH e solventes orgânicos, as tornam biocatalisadores relevantes (ISMAIL; KASHTOH; BAEK, 2021).

As lipases são habitualmente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de tecidos animais, vegetais e de microrganismos. As microbianas são mais usadas industrialmente devido às características como estabilidade e variedade de atividade catalítica. Quando relacionado à produção de enzimas, estas possuem maior facilidade de cultivo e os meios utilizados são de baixo custo (MURUCI, 2012).

As lipases microbianas constituem um importante grupo de enzimas com valor biotecnológico, sobretudo devido à aplicabilidade em vasta gama de reações e a facilidade de produção em massa. O uso comercial de lipases é um negócio bilionário que compreende uma variedade de aplicações, em diferentes setores industriais como o alimentício (modificação do sabor, síntese de aromas, e maturação de laticínios e embutidos), farmacêutico (resolução de enantiômeros e composição de medicamentos, degradação de óleos e gorduras), na indústria química (síntese de ésteres), ambiental (biorremediação e tratamento de efluentes, decompondo e removendo substâncias oleosas), papelreira (remoção de componentes hidrofóbicos), couro (remoção de lipídios de peles animais), energética (síntese de biodiesel), têxtil (exclusão de lubrificantes) na produção de cosméticos (remoção de lipídios), detergentes (hidrólise de gorduras) e produtos agrícolas (pesticidas) (BILAL *et al.*, 2021; JIMÉNEZ; MARTÍNEZ, 2017; COLLA; REINEHR; COSTA, 2012).

3.1.1 Lipase de *Penicillium corylophilum*

Dentre os microrganismos produtores de lipases, estão os fungos dos gêneros *Trichosporon*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, leveduras dos gêneros *Tulopsis* e *Candida*, e bactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Chromobac-*

terium e *Bacillus* entre outros (ALVES *et al.*, 2019; MELO, 2012; BARON, 2008; BEVILAQUA, 2005).

Segundo Li e Zong (2010), os fungos do gênero *Penicillium* são bons produtores de lipase.

O fungo *P. corylophilum* tem sido relatado na literatura para diferentes aplicações. A primeira, de acordo com o site *science direct*, ocorreu em 1970 e estava relacionado às flutuações sazonais de fungos do solo egípcio (MOUBASHER; ELDOHLOB, 1970). O fungo está associado à produção de ácido oxálico em monumentos históricos (GÓMEZ-ALARCÓN; MUÑOZ; FLORES, 1994) e mais recentemente foi utilizado para produção de nanocompósitos de CuO/ZnO através de uma abordagem de biossíntese verde (FOUDA *et al.*, 2020).

Em relação à produção de lipases, foram produzidas por *P. corylophilum* em fermentação submersa (FS), e a influência do óleo de oliva, como indutor, foi analisada nas lipases extracelulares e as ligadas ao micélio. Os resultados mostraram que no terceiro dia FS para o meio suplementado com azeite, a atividade extracelular da lipase aumentou em quatro vezes (163 mU g^{-1}) em relação ao meio sem azeite (42 mU g^{-1}). Para o meio não induzido, a lipase ligada ao micélio também apresentou a maior atividade específica (146 mU g^{-1}) após três dias de cultivo, enquanto, sob condições de indução, o valor máximo (188 mU g^{-1}) foi deslocado para o dia seguinte (ROMERO *et al.*, 2014).

O potencial do extrato lipolítico, obtido por FS e oriundo deste microrganismo também foi avaliado em reações de esterificação em diferentes meios reacionais, sendo o melhor resultado para o sistema de micelas reversas em *n*-heptano, onde o rendimento do oleato de *n*-butila foi de 100% em 12 h, nas seguintes condições, 0,38 mg de proteína por mL do meio reacional, 37 °C, 200 rpm, razão molar (RM) ácido álcool de 1:3 (BARON *et al.*, 2005).

Camargo (2015) relatou pela primeira vez a produção de lipases de *P. corylophilum* por FES, utilizando farelo de semente de girassol e bagaço de cana-de-açúcar como substratos. Apesar da atividade frente ao palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) ter sido baixa ($0,6 \text{ U g}^{-1}$ de substrato seco), o sólido fermentado apresentou potencial para ser usado na síntese de ésteres, sendo observado nos estudos preliminares, rendimento de 56% para oleato de etila, nas seguintes condições, 37 °C em *n*-heptano como solvente, 1 g do sólido fermentado e RM ácido álcool de 1:2.

Atualmente, não há demais citações na literatura da utilização deste fungo para produção de lipases por fermentação sólida, enfatizando seu potencial inovador e por isso, justifica-se a continuidade dos estudos, a fim de contribuir com a produção eco-amigável de lipases por *P. corylohilum* por FES.

3.2 Fermentação no estado sólido

A fermentação no estado sólido (FES) envolve o cultivo de microrganismos em substratos insolúveis com baixo percentual de água em sua composição (MESSIAS *et al.*, 2011), sendo que a quantidade de água deve ser suficiente para o crescimento e metabolismo dos microrganismos (SANTOS *et al.*, 2008).

A FES possui algumas vantagens quando comparada a FS (fermentação submersa), sendo: fácil manejo e manutenção, menor custo de operação, maior concentração de produtos formados, facilidade na extração do produto com a utilização de solventes apropriados (geralmente água), espaço físico reduzido, simulação do habitat natural dos microrganismos, levando a uma facilidade de crescimento no substrato, maior produção enzimática e requerendo menor energia, utilização de resíduos agroindustriais como substratos para obtenção de produtos com valor agregado, acarretando na redução de custos e diminuição de problemas ambientais. (GEOFFRY; ACHUR, 2018; AGUIEIRAS; OLIVEIRA; FREIRE, 2015; MENONCIN *et al.*, 2009).

Ressaltam-se os prós da fermentação sólida, como, simplicidade no preparo do meio de cultura; diminuição de contaminações; redução dos efluentes líquidos a tratar; resíduos sólidos mais estáveis após a fermentação; produção concentrada de metabólitos e eliminação da formação de espuma (RODRIGUES, 2006; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Em sumo, além da alta produtividade, as enzimas produzidas pelo processo de fermentação sólida são menos suscetíveis a problemas de inibição pelo substrato, são mais estáveis em termos de temperatura e pH (FARINAS, 2015; SINGHANIA *et al.*, 2009).

3.2.1 Substratos

Em um país com abundância de biomassa e resíduos industriais, o uso de resíduos como substrato para a produção de lipases, auxilia para redução dos custos dos bioprocessos, agrega valor a esses materiais e evita a geração de problemas ambientais. Desse modo, a fermentação no estado sólido é uma técnica economicamente vantajosa para o Brasil (BOSSA *et al.*, 2019).

Os resíduos renováveis incluem uma variedade de substratos, como farelos, tortas, cascas, caroços e borras. Esses materiais gerados pelas indústrias, além de fonte de matéria orgânica, podem ser usados como fonte de proteínas, enzimas e óleos essenciais, sendo passíveis de recuperação e aproveitamento (COELHO *et al.*, 2001).

É importante considerar que cada substrato apresenta características individuais, como retenção de umidade e disponibilidade de nutrientes, a escolha está relacionada à capacidade de adequação do microrganismo ao seu ambiente (ALBANO, 2012).

De acordo com a literatura para fermentação no estado sólido, os substratos são considerados suportes fisiológicos e agem como fontes de nutrientes (PANDEY, 2003).

Alguns trabalhos expõem o uso de resíduos agroindustriais, para produção de lipases por FES, como a torta de babaçu, farelo de trigo, bagaço de cana, farelo de soja, casca de arroz, casca de milho, entre outros (SANTOS *et al.*, 2018; FERNANDES, 2007). Baseado nos estudos de Camargo (2015) e disponibilidades de alguns substratos, selecionou-se três para dar continuidade aos estudos para produzir lipases de *P. corylophilum* utilizando FES, trigo moído ou triguilho (T), farelo da semente de girassol (FSG) e torta de milho (TM).

O farelo de trigo corresponde a película externa da parte comestível do grão, sendo o mesmo um potencial substrato para produção enzimática por FES, se diferencia do T, utilizado no presente trabalho, que é o grão integral pré-cozido, seco e triturado. Até o momento, não foram encontrados trabalho utilizando o T como substrato. Em relação ao farelo de trigo, Bakker (2017) estudou a FES com este substrato obtendo atividade de 11,78 U g⁻¹. O trabalho desenvolvido por Damaso *et al.* (2008), demonstrou atividade de 48,6 U gds⁻¹ ao utilizar o farelo de trigo como substrato e azeite de oliva como indutor, à 32° C após 48 horas. Kumar (2011) usou resí-

duos de graxa como substrato e meio Czepek-dox, suplementando com farelo de trigo, à 32 °C por 8 dias, obtendo atividade enzimática de 38 U mL⁻¹. Essas distintas aplicações mostraram que o uso de farelo de trigo tem impacto significativo na produção de lipase, assim como a otimização apresentada por Pitol *et al.* (2017) entre farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (50:50), suplementado com ureia, alcançando atividade de 113 U g⁻¹ em biorreator piloto.

A mistura entre dois substratos também foi estudada por Salum *et al.* (2010) e Serres *et al.* (2017), mas dessa vez, sendo composto pelo farelo de semente de girassol e o bagaço de cana-de-açúcar, apresentando potencial para diminuição de gastos. De acordo com os resultados apresentados por Camargo (2015), o FSG é um material promissor, para produzir lipases de *P. corylophilum* por FES, possibilitando a aplicação do sólido fermentado em biocatálise.

O subproduto proveniente do processamento do milho (TM) é um resíduo agroindustrial que foi utilizado como substrato para a produção de lipases de *Burkholderia cepacia*, por FES e a atividade foi de 108 U g⁻¹. O sólido fermentado foi aplicado em reações de esterificação e transesterificação (FERNANDES *et al.*, 2007).

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes

Os materiais empregados como meio de cultivo, farelo de semente de girassol (FSG) (Sempre Vita) e trigoilho (Kinino) (T), foram adquiridos em comércio local. Já a torta de milho (TM), foi gentilmente cedida pela Caramuru Alimentos®.

O óleo de soja (Concórdia), utilizado como indutor nos cultivos com TM e T e óleo de oliva extra virgem (Galo), empregado na dosagem da atividade lipolítica pelo método titulométrico, também foram adquiridos em comércio local.

Todos os demais reagentes utilizados neste trabalho foram grau analítico.

4.2 Microrganismo

O fungo *P. corylophilum* foi isolado no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise-UFRP e sua caracterização taxonômica foi realizada no Laboratório de Coleção de Cultura de Fungos da Fundação Oswaldo Cruz, onde está depositado como *P. corylophilum* Dierckx (IOC-4211).

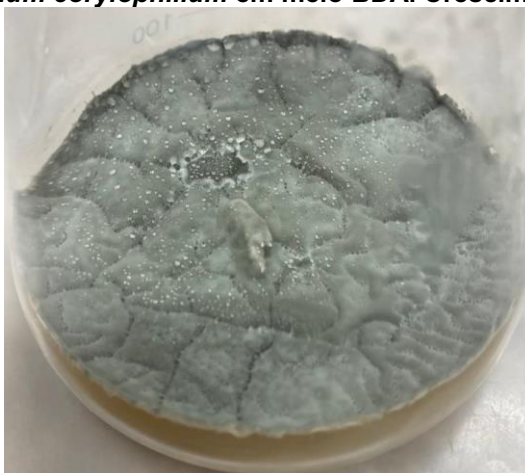
4.3 Esterilização dos meios

Para assegurar as condições estéreis de crescimento do fungo, desde o pré-cultivo até a fermentação, assim como todos os materiais utilizados, foram feitas esterilizações em autoclave a 121 °C com pressão de 1 atm por 15 min.

4.4 Preservação da cepa

Usou-se o meio BDA (batata, dextrose e ágar), que foi anteriormente esterilizado e adicionado em Erlenmeyer; o fungo foi repicado em três regiões diferentes do frasco e incubado a 29 °C. Depois do seu crescimento, em 6 dias, foi armazenado lacrado com papel filme e mantido a 4 °C.

Figura 2- Fungo *Penicillium corylophyllum* em meio BDA. Crescimento após 6 dias, a 29 °C



Fonte: Autoria própria (2021)

4.5 Composição dos meios e preparação dos substratos

Para a produção da enzima, foram utilizados como substratos T, FSG e TM. Para os meios T e TM, houve adição de 5% (v/m) óleo de soja como indutor. A umidade dos substratos foi fixada em 55%, sendo avaliada a solução umidificadora, água ou tampão fosfato pH 7,0, 0,05 mol L⁻¹.

A semente de girassol foi triturada, tamisada e embalada em sacos plásticos, sendo utilizadas as frações do farelo com granulometria entre 0,85 e 1,70 mm de diâmetro para os estudos de FES. Os demais substratos foram utilizados sem preparação prévia.

4.6 Condições de cultivo

O microrganismo foi avaliado em três tempos de cultivo distintos (5, 6 e 7 dias), sendo retirada triplicatas (T, FSG e TM) do cultivo a cada tempo. Os cultivos foram feitos utilizando-se 4 g dos substratos em Erlenmeyers de 250 mL. O processo de umedecimento foi realizado em duas etapas, sendo a primeira anterior à esterilização e outra no momento do inóculo dos esporos. Sendo adicionado o volume de água/tampão até faltar apenas 0,4 mL e a mistura foi homogeneizada com bastão de vidro. Para os substratos sólidos umedecidos T e TM foram acrescentados, 200 µL de óleo de soja de forma a obter uma porcentagem de 5% de óleo (v/m) em cada Erlenmeyer. O volume de 0,4 mL restante foi adicionado na forma de suspensão de

esporos no momento do inóculo do microrganismo, atingindo o teor de umidade estabelecido.

Para obtenção dos esporos foi feita uma raspagem do fungo crescido em Erlenmeyers contendo BDA, segundo item 4.4. A raspagem foi feita com água contendo 0,01% de Tween 80. Uma alíquota da suspensão coloidal de esporos obtida foi levada à câmara de Neubauer, onde é feita uma contagem dos esporos e a determinação da concentração dos mesmos. Com os valores obtidos, fez-se uma diluição da suspensão original em tampão a fim de obter uma solução de $4,0 \times 10^7$ esporos. mL⁻¹ (10^7 esporos. g⁻¹ de substrato seco) e 0,4 mL utilizado para inocular o meio umedecido de cada Erlenmeyer. Os cultivos foram incubados a 29 °C e triplicatas de cada meio retirada em três tempos, 5, 6 e 7 dias. Após o período de fermentação, os sólidos fermentados foram armazenados em refrigerador a 4 °C para posterior dosagem de atividade (item 4.9.1) e liofilização.

4.6.1 Determinação da umidade por infravermelho

A umidade foi determinada em analisador de umidade com lâmpada infravermelha halógena IV3100 (Gehaka).

4.6.2 Estudo da solução umidificadora

Foram estudadas as soluções umidificadoras água destilada e tampão fosfato pH 7,0 0,05 mol L⁻¹. A primeira foi estudada para os três meios, nos dias 5, 6 e 7. A utilização da solução tampão fosfato foi estudada no tempo de 6 dias para os três meios. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.3 Estabilidade à liofilização

Para verificar a estabilidade do sólido fermentado à liofilização, 2 g dos sólidos fermentados após 144 h de fermentação foram liofilizados em liofilizador (SL-404, Solab) por 48 h. A atividade residual do sólido fermentado seco foi dosada através da hidrólise do pNPP.

4.8 Custo-benefício

Para o cálculo aproximado da produção de lipases, os custos foram relacionados para cada 100 g do substrato seco, sendo os valores da semente de girassol (R\$ 17,60/ kg) e trigoilho (R\$ 5,50/ kg) adquiridos em comércio local e para a torta de milho, o valor foi fornecido pela Caramuru Alimentos® (R\$ 1,50/ kg), que gentilmente forneceu o material para a realização do trabalho. Demais itens também foram adicionados aos cálculos, como água destilada (R\$ 22,80/ 5 L), óleo de soja (R\$ 7,39/ 900 mL), BDA (R\$ 386,51/ 500 g) e energia elétrica (R\$ 6,24 kWh).

4.9 Métodos analíticos

4.9.1 Determinação da atividade lipolítica

Para a determinação da atividade lipolítica, foram utilizados dois métodos: o método espectrofotométrico de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) e o método titulométrico (apenas para o meio com maior atividade). Para ambos os métodos, a atividade foi expressa em U g⁻¹s (U) e refere-se a unidades de atividade por grama de sólido fermentado obtido ao fim da fermentação.

4.9.1.1 Método de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila

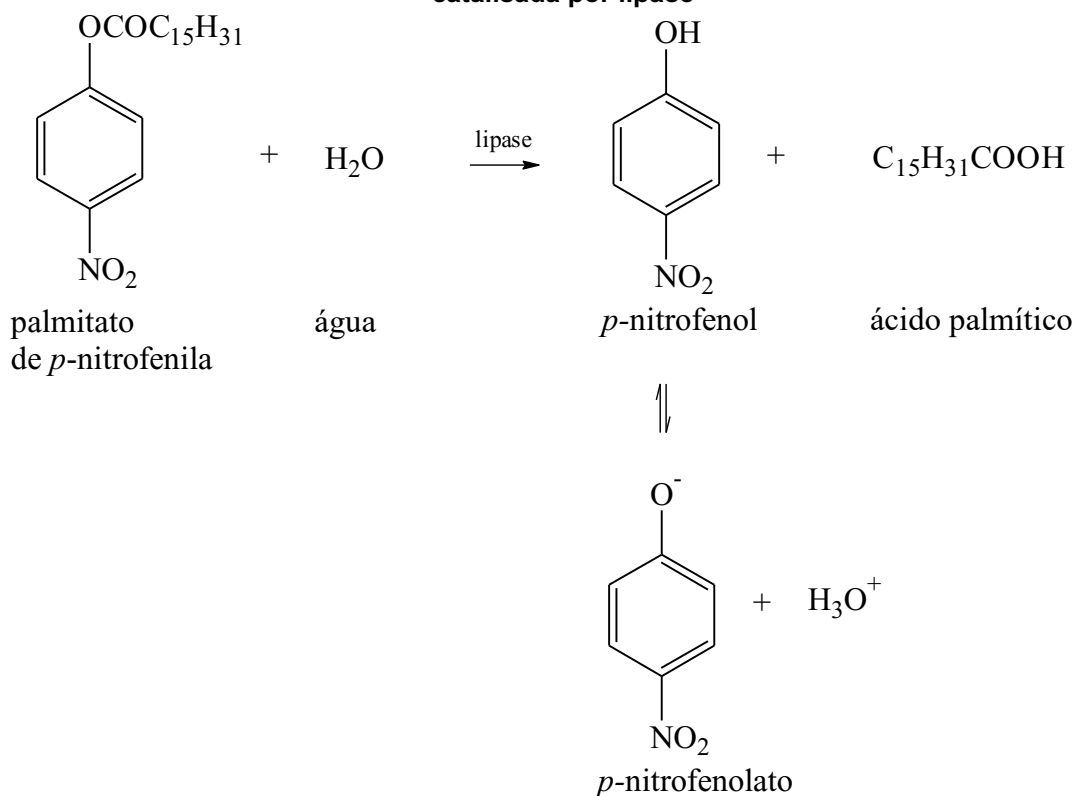
Este método espectrofotométrico foi utilizado durante o trabalho para determinar a atividade lipolítica do fermentado obtido ao final da fermentação foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979). Baseia-se na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactante o Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol, de coloração amarela é seguida a 410 nm sendo a atividade lipolítica calculada em unidades por g (sólido fermentado após cultivo) (Figura 3) conforme a Equação 1.

$$A = \frac{C_{\text{ang}} \cdot V}{\epsilon \cdot M} \quad (1)$$

sendo: C_{ang} : coeficiente angular obtido da cinética de reação (absorbância x tempo em segundos); V : volume da reação; ϵ : coeficiente de extinção molar do p NPP a pH 8,0; m : massa do sólido fermentado (em g).

A atividade é realizada utilizando solução A (3 mg mL⁻¹ palmitato de p -nitrofenila em 1 mL de isopropanol) com solução B (2 g de Triton X-100, 0,5 g de goma arábica em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 8,0), na proporção 1:9. Desta solução, 0,9 mL são colocados em uma cubeta, estabilizada a temperatura a 40°C sendo adicionado 0,1 mL de tampão (branco). Após a leitura do “branco” a atividade enzimática dos sólidos fermentados é realizada. A reação ocorre com controle de temperatura (40 °C), sob agitação em ultrassom (Schuster L200) utilizando Erlenmeyers de 25 mL contendo 10 mL de meio reacional (1 mL da solução A com 9 mL da solução B) e iniciada com a adição de 5 mg do sólido fermentado. A cinética das reações foi assistida em diferentes intervalos de tempo (1 a 5 min) transferindo-se alíquotas de 1 mL para uma cubeta e simultânea leitura das absorbâncias (410 nm), sendo as reações realizadas em triplicata para análise estatística.

Figura 3- Representação esquemática da reação de hidrólise do palmitato de p -nitrofenila catalisada por lipase



Fonte: Camargo (2015)

4.9.1.2 Método titulométrico

O método titulométrico, proposto por Stuer *et al.* (1986) fundamenta-se na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima sobre triglicerídeos (Figura 4) com solução de NaOH (0,05 mol L⁻¹). Este método foi aplicado para dosar os ácidos graxos liberados na hidrólise do óleo de oliva, em meio aquoso, apenas para o meio com maior atividade lipolítica determinada pelo método do pNPP.

A atividade lipolítica (A) foi calculada em unidades (U) por g do sólido fermentado após cultivo (Equação 2).

$$A = \frac{(V_a - V_b) \cdot M}{E \cdot t} \quad (2)$$

Sendo:

V_a: Volume gasto de solução de NaOH para as reações contendo enzima (mL);

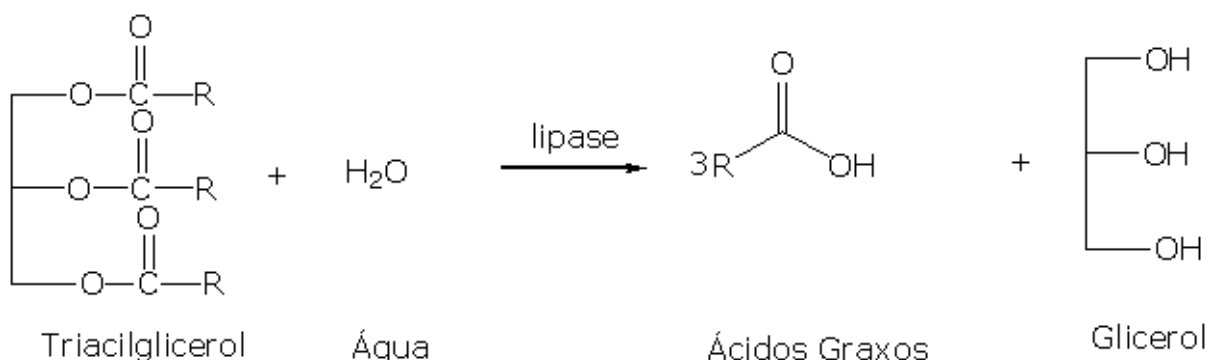
V_b: Volume gasto de solução de NaOH para o meio reacional sem enzima (branco) (mL);

M: Concentração da solução de NaOH (0,05 mol L⁻¹);

E: Quantidade de sólido fermentado (g);

t: Tempo de reação 30 (min).

Figura 4 - Representação esquemática da reação de hidrólise pelo método titulométrico



Fonte: Adaptado de Mendes *et al.* (2005)

Adicionou-se 5 mL de meio reacional (9 g de óleo, 3,5 mL de triton-X100 e 37 mL de tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹, pH 8,0) em Erlenmeyer de 125 mL com 300 mg da enzima. Em seguida, os Erlenmeyer foram agitados em ultrassom (Schuster L200) por 30 minutos a 40 °C. As reações foram interrompidas adicionando-se 16

mL da solução 1:1 (v/v) de acetona e etanol. Por fim, o meio reacional foi titulado com NaOH 0,05 mol L⁻¹. Utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de ácidos graxos por minuto nas condições do ensaio. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.10 Análise estatística através do teste de Tukey

A análise estatística foi empregada para verificar diferenças significativas entre amostras independentes após a etapa de obtenção do sólido fermentado para quantificação da atividade lipolítica e determinação da atividade. Para isso, utilizou-se ANOVA (Análise de Variância) e o teste de Tukey a 95% de probabilidade (TUKEY, 1953).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fungos filamentosos podem estar mais adaptados aos processos de FES, particularmente para a produção de lipases. A bioconversão de substratos sólidos por estes microrganismos estaria relacionada ao desenvolvimento de hifas durante seu crescimento, boa tolerância ao baixo teor de umidade e condição de alta pressão osmótica (GEOFFRY; ACHUR, 2018; COLLA *et al.*, 2016; RAIMBAULT, 1998). Por isso, os resultados obtidos neste trabalho visam contribuir com informações relevantes relacionadas à produção de lipases de *Penicillium corylophilum* por fermentação no estado sólido (FES).

5.1 Determinação da umidade com lâmpada infravermelha

A fermentação em estado sólido (FES) consiste no crescimento de microrganismos em materiais sólidos na ausência de água livre, entretanto, o substrato deve possuir umidade suficiente, presente na forma adsorvida na matriz sólida (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

O teor de água nos processos de FES varia entre 50 e 80 %. No geral, fungos necessitam de baixo teor de água, cerca de 40-60% de umidade pode ser satisfatório, contudo, a seleção do substrato depende de vários fatores, comumente relacionados com o preço e a disponibilidade e assim sendo, pode envolver a triagem de diversos resíduos agroindustriais (SINGHANIA *et al.*, 2009).

Para estudar os diferentes meios de cultivo, optou-se por fixar o percentual de umidade em 55%, pois em estudos preliminares observou-se que havia atividade enzimática na referida condição (CAMARGO, 2015). Porém, como a quantidade de água presente nos substratos pode variar, a quantidade de água adicional para alcançar a umidade de 55% foi avaliada em analisador de umidade com lâmpada infravermelha (Tabela 1). No processo de fermentação, o volume de água foi adequado à quantidade de substrato utilizada (Tabela 2).

Tabela 1- Determinação da quantidade de água necessária para os diferentes substratos utilizados na fermentação no estado sólido através do analisador de umidade com lâmpada infravermelha

Substratos	Volume de água (mL) adicionada para umidade de 55%/g de Substrato
FSG	2,4
TM	2,8
T	3,0

Fonte: Autoria própria (2021)

Tabela 2- Quantidades de água adicionadas para umidificar os substratos utilizados na fermentação no estado sólido para produção de lipases de *Penicillium corylophilum*

Substrato	Massa (g)	Água (mL)	Solução Esporos (mL)	Óleo de Soja % (v/m)
FSG	4	9,2	0,4	-
TM	4	11,6	0,4	5
T	4	10,8	0,4	5

Fonte: Autoria própria (2021)

Analisando a composição físico-química dos substratos a partir de dados da literatura ou de informações do fabricante (Tabela 3), o farelo da semente de girassol (FSG) apresenta como vantagem alto conteúdo lipídico ou gorduras totais (superiores a 25%), tornando desnecessária a adição de indutores. Os substratos trigoilho (T) e torta de milho (TM) possuem altos teores de proteínas (16 e 17 %) e fibras (16 e 12%), mas baixos teores lipídicos (1 e 2 %).

Indutores de lipase, como óleos vegetais, tributirina, Tween 20 e Tween 80, são reportados com frequência na literatura (KANCHANA *et al.*, 2011), sendo adicionados aos substratos com baixos teores lipídicos. Por isso, para os meios contendo T e TM foram adicionados 5% (v/m) de óleo de soja. Entretanto estas condições não estão otimizadas e o tipo de óleo e a porcentagem podem ser avaliados futuramente. Neste trabalho, o critério para a escolha do tipo de óleo foi o menor custo do óleo de soja em relação aos outros, como oliva, girassol ou milho. Em relação à porcentagem de óleos vegetais, a literatura relata, em geral, a adição de 1 a 7% v/m de óleo ao meio de cultivo (Tabela 4).

Tabela 3- Composição físico-química dos substratos a partir de dados da literatura ou de informações do fabricante

Substrato	Gorduras totais (%)	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Fibras (%)	Fonte/Procedência
FSG	34	47	10	ND	Camargo (2015)
	26	46	18	28,5	Fernandes (2007)
T	1	56	16	16	Fabricante (Kinino)
TM	0,40 a 1,20	48	11	5	Fabricante (Caramuru Alimentos®)

% (m/m); ND: não determinado

Fonte: Autoria própria (2021)

Tabela 4 - Fermentação no estado sólido para produção de lipases, análise de diferentes indutores

Microrganismo	Substrato	Principais Resultados	Lipídeo Indutor	Fonte
<i>Aspergillus niger</i>	farelo de arroz e torta de semente de <i>Jathropa</i>	176 U mL ⁻¹ , 5 dias	1% de óleo de azeite	Putri <i>et al.</i> (2020)
<i>Aspergillus niger</i>	torta de dendê farelo de soja caroço de coco	163,33 U g ⁻¹ SS, para farelo de soja, 9 dias	4% de óleo de oliva	Prabaningtyas <i>et al.</i> (2018)
<i>Aspergillus niger</i>	farelo de arroz casca de arroz	38,67 U g ⁻¹ SS, para farelo de arroz, 5 dias	2% de azeite de oliva	Utami <i>et al.</i> (2017)
<i>Aspergillus niger</i>	casca de mandioca	72,26 U g ⁻¹ SS, 7 dias	1% de gordura suína	Kempka <i>et al.</i> (2017)
<i>Trichoderma sp.</i>	cacho de frutas vazio de dendê (OPEFB)	0,39 U g ⁻¹ SS, 5 dias	3% de azeite de oliva	Musa <i>et al.</i> (2017)

U mL⁻¹: unidade de atividade por mililitro de enzima; U g⁻¹ SS: unidade de atividade por grama de substrato seco.

Fonte: Autoria própria (2021)

5.2 Fermentação no estado sólido utilizando diferentes substratos

O estudo do tipo de substrato a ser empregado na FES é um dos parâmetros mais importantes a serem estudados na produção de enzimas, pois o material atua como suporte físico e como fonte de nutrientes para o crescimento do microrganismo, em alguns casos. A seleção por materiais de baixo custo e em abundância pode reduzir o custo da produção. A utilização do uso de resíduos agroindustriais como substratos alternativos, uma adaptação aos processos por FES, permitiu reduzir muito o custo de produção das lipases, além de auxiliar na diminuição da poluição ambiental (GEOFFRY; ACHUR, 2018; CONTESINI *et al.*, 2010).

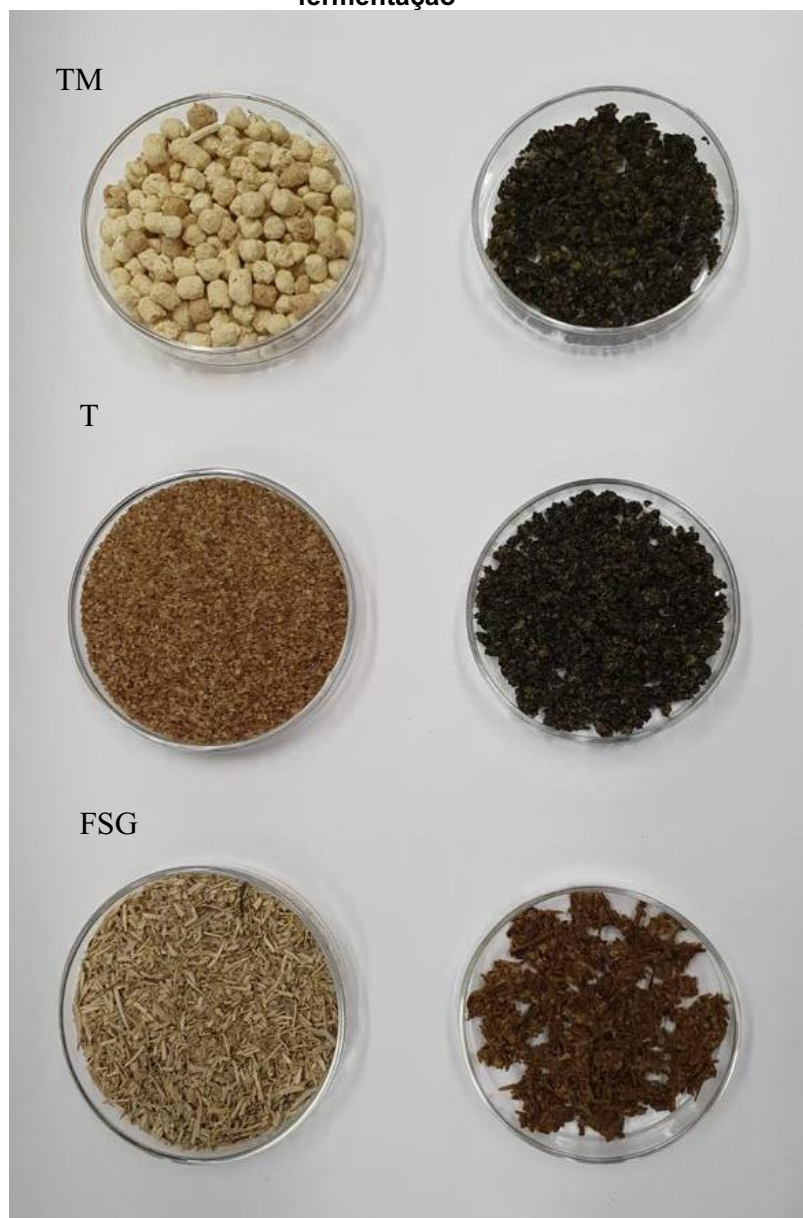
No presente estudo, os materiais empregados como meio de cultivo, farelo de semente de girassol, trigoilho e torta de milho possuem baixo custo, (17,60/ kg girassol e 5,50/ kg trigo, valor disponibilizado pelo fabricante) sendo o menor valor para a torta de milho, um material obtido do processamento após a extração do óleo de milho, é empregado como complemento na ração animal (R\$ 1,50 reais/kg valor disponibilizado por Caramuru Alimentos®).

Em estudos anteriores, observou-se que a maior produção de lipase por *Penicillium corylophilum* estava entre o quinto e o sétimo dia (CAMARGO, 2015), por isso a fermentação, neste trabalho, foi realizada durante sete dias, sendo a atividade enzimática analisada em 120 h (5 dias), 144 (6 dias) e 168 h (7 dias). Os meios antes e após a fermentação podem ser observados na Figura 5. Após a fermentação, observa-se o fermentado com a coloração típica do fungo, o que caracteriza seu desenvolvimento e crescimento sobre o substrato, porém para verificar se houve produção de lipases, o fermentado foi utilizado em reações de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) (Figura 6).

Observa-se que a maior atividade foi obtida com o trigoilho ($32,3 \pm 5,5 \text{ U g}^{-1} \text{ S}$), em 168 h. Entretanto, de acordo com a análise estatística (Tukey), observa-se que o grupo amostral relativo ao cultivo com trigoilho (T) seria diferente apenas do grupo amostral relativo ao cultivo contendo o próprio trigoilho, mas em 144 h, com atividade de $15,2 \pm 4,1 \text{ U g}^{-1} \text{ S}$. Os demais grupos são estatisticamente iguais entre si quando comparados dois a dois. A falta de significância pode estar associada aos altos valores dos desvios para os cálculos das atividades, e neste caso pode ser

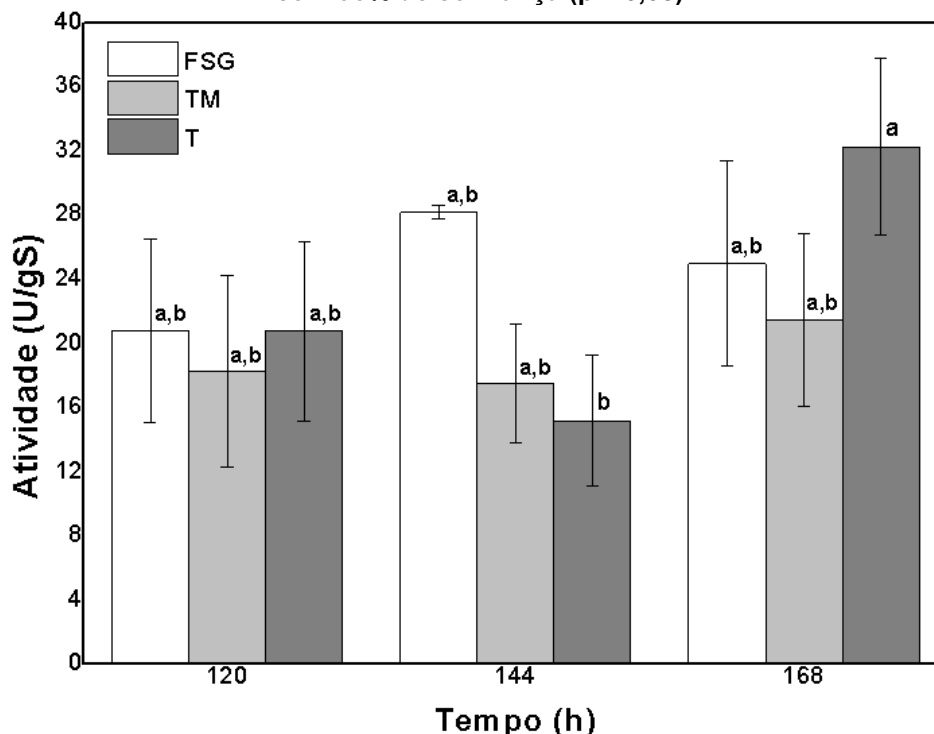
atribuída à característica do sólido fermentado, que poderia conter quantidades distintas da enzima nas réplicas realizadas.

Figura 5 - Substratos para a produção de lipases de *Penicillium corylophilum* por fermentação no estado sólido. TM: torta de milho; T: trigoilho; FSG: farelo de semente de girassol. À direita, os substratos antes do processo de fermentação e à esquerda, o fermentado após 6 dias de fermentação



Fonte: Autoria própria (2021)

Figura 6 – Atividade lipolítica relativa aos sólidos fermentados obtidos do cultivo de *Penicillium corylophilum* utilizando diferentes substratos. Condições: 55% de umidade, 29°C. Condições de ensaio na dosagem da atividade em pNPP: 40 °C, tampão fosfato pH 8,0, 0,05 mol L⁻¹. ^{a,b,c}: letras acima nas colunas indicam diferenças significativas segundo o teste Tukey com 95% de confiança ($p \leq 0,05$)



Fonte: Autoria própria (2021)

Em relação à produção de lipases utilizando meios de cultivo semelhantes, Camargo (2015) iniciou os estudos, utilizando o fungo *P. corylophilum* e o farelo de semente de girassol como substrato, alcançando a atividade lipásica de $0,6 \text{ U g}^{-1}\text{SS}$ através do método pNPP. A dosagem foi realizada por extração da enzima e expressa em unidades enzimáticas por grama do substrato seco (Tabela 5). No presente trabalho, o método foi adaptado, realizando a dosagem diretamente com o sólido fermentado e por isso a atividade foi expressa em unidades enzimáticas por grama do sólido fermentado ($\text{U g}^{-1}\text{S}$).

Em se tratando de processos fermentativos utilizando resíduos industriais, Coelho *et al.* (2018) avaliou a produção de lipase por fermentação em estado sólido por intermédio do microrganismo *A. niger* usando o farelo de trigo como substrato e constatando pelo método titulométrico a atividade de $107,68 \text{ U g}^{-1} \text{ SS}$, com uso de óleo de coco como indutor. Já Fernandes *et al.* (2017) empregou o microrganismo *B. cepacia* tendo como substrato o farelo de milho, obtendo atividade de $108 \text{ U g}^{-1} \text{ SS}$ pelo método pNPP. O outro trabalho de Fernandes (2017), usando o mesmo microrganismo e método, analisou a produção de lipases em diferentes substratos,

sendo que o farelo de semente de girassol evidenciou maior atividade lipolítica (240 U g⁻¹ SS), sem adição de óleo como indutor; seguido do farelo de casca de trigo (227,5 U g⁻¹ SS), adicionando óleo de oliva como indutor e a menor atividade foi com a torta de milho (110 U g⁻¹ SS), tendo óleo de milho como indutor (Tabela 5).

Tabela 5 - Citações sobre produção de lipases por FES

Microrganismo	Condições de cultivo	Atividade /método	Ref
<i>Penicillium corylophilum</i>	Triguilho; 55% de ω ; 29 °C; 168 h; com óleo de soja como indutor.	32,3* (pNPP)	Este trabalho
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo; 110 mL/100g de meio de solução de HCl 0,1 mol/L e 0,8% como fonte de nitrogênio (NH ₄) ₂ SO ₄ , 49,13% de ω ; 32°C; 48 h; com óleo de coco como indutor.	107,68** (Titulométrico)	Coelho <i>et al.</i> , 2018
<i>Penicillium corylophilum</i>	Farelo de semente de girassol; 55% de ω ; 29 °C; 144 h.	0,6** (pNPP)	Camargo, 2015
<i>Burkholderia cepacia</i>	Farelo de milho; 55% de ω ; 37°C; 72 h; com óleo de milho como indutor.	108 (pNPP)	Fernandes <i>et al.</i> , 2007
<i>Burkholderia cepacia</i>	Farelo de semente de girassol; 55% de ω ; 29°C; 72 h.	240** (pNPP)	Fernandes, 2007
<i>Burkholderia cepacia</i>	Torta de milho; 55% de ω ; 29°C; 72 h; com óleo de milho como indutor.	110** (pNPP)	Fernandes, 2007
<i>Burkholderia cepacia</i>	Farelo de casca de trigo; 55% de ω ; 29°C; 72 h, com óleo de oliva como indutor.	227,5** (pNPP)	Fernandes, 2007

*U g⁻¹: unidades de atividade por grama do sólido fermentado, **U g⁻¹ SS: unidades de atividade por grama do sólido seco; ω : teor de umidade

Fonte: Autoria própria (2021)

Considerando as diferenças em termos de condições, quando se analisou o sólido fermentado contendo as lipases de *P. corylophilum*, houve boa produção enzimática. Como o processo de fermentação não está completamente otimizado, os resultados podem ser ainda melhorados.

5.3 Efeito das soluções umidificadoras

O efeito da solução umidificadora para a produção de lipase por FES utilizando diferentes substratos demonstrou que a atividade enzimática é maior nos três meios quando utilizado água como solução para umidificar os substratos, em relação ao tampão fosfato (pH 7, 0,05 mol L⁻¹), tornando o processo mais viável em termos de custo (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito das soluções umidificadoras sobre a produção das lipases de *Penicillium corylphilum* for fermentação no estado sólido. Condições: 55% de umidade; 144 h, 29 °C. Condições de ensaio na dosagem da atividade em pNPP: 40 °C, tampão fosfato pH 8,0, 0,05 mol L⁻¹

	Atividade (U g ⁻¹ S)		
	FSG	TM	T
Água	28,2 ± 3,8	17,5 ± 3,7	15,2 ± 4,1
Tampão pH 7 0,05 mol L ⁻¹	20 ± 4,5	11,4 ± 0,9	12,9 ± 1,3

Fonte: Autoria própria (2021)

5.4 Efeito da liofilização dos sólidos fermentados

O processo de liofilização foi acompanhado com o sólido fermentado obtido após 6 dias de fermentação. Os resultados mostram que a atividade residual foi de 83,24% para FSG, 40% para TM e 37,53% para T (Tabela 7).

Quando as enzimas estão em condições distante da ótima, podem acontecer mudanças em sua estrutura, acarretando a desnaturação enzimática e consequentemente na perda de atividade catalítica. Mena *et al.* (2015) cita em seu trabalho um decréscimo da atividade enzimática após liofilização, possivelmente ocasionada pela desnaturação da enzima. Em sua pesquisa sobre proteínas, Junior; Parra e Pitombo (2006) relatam que problemas relacionados com o congelamento e a desidratação induzidos pela liofilização podem levar a instabilidade proteica, salientando que um parâmetro importante a ser definido é a taxa de congelamento.

Tabela 7 - Efeito da liofilização na atividade dos sólidos fermentados obtidos em 144 h de cultivo de *Penicillium corylophilum* utilizando água como solução umidificadora (55% de umidade). Condições de ensaio na dosagem da atividade em μNPP : 40 °C, tampão fosfato pH 8,0, 0,05 mol L⁻¹

	Meios		
	FSG	TM	T
	Antes da liofilização		
Massa inicial (g)	2,0011	2,0045	2,0002
Atividade inicial (U g ⁻¹ S)	28,2 ± 3,8	17,5 ± 3,7	15,2 ± 4,1
Atividade total inicial (U)	56,43	35,08	30,40
	Após a liofilização		
Massa final (g)	0,9103	0,623	0,3566
Atividade final (U g ⁻¹ S)	51,6	22,8	32
Atividade total final (U)	46,97	14,2	11,41
Perda de água (%)	54,5	68,9	82,2
Atividade residual (%)	83,24	40	37,53

Fonte: Autoria própria (2021)

5.5 Análise do custo-benefício para fermentação no estado sólido em diferentes meios de cultivo

Para avaliar o custo-benefício para a produção de lipases por *Penicillium corylophilum* nos diferentes meios de cultivo, avaliou-se o pré-cultivo, que inclui a preparação do BDA (BDA e água); cultivo, incluindo o substrato, água e óleo (para milho e trigo) e a energia gasta durante a utilização da autoclave e estufa.

É válido ressaltar que em nenhum dos três dias foi ultrapassado os 30 kWh (consumo definido para padrão monofásico, conforme Resolução Normativa 414 de 2010 da ANEEL- Agência Nacional de Energia Elétrica), é cobrado apenas a taxa mínima, ou seja, não há diferença de valores de energia para 5, 6 ou 7 dias. Porém, deve-se levar em conta o desgaste de equipamentos e uso de mão de obra.

Para avaliar o custo-benefício, considerou-se a maior atividade para cada substrato em relação à variação do tempo (5, 6 e 7 dias) (Tabela 8). Os valores em reais para a produção das lipases por FES foram muito próximos para os três tipos de substratos, apesar da TM e T apresentarem menor custo por quilo em relação ao FSG. Isso se deve ao fato dos cultivos com TM e T haver a necessidade de adição de óleo e água em maior quantidade, quando comparado ao cultivo com FSG, sendo

estes dois itens os responsáveis pelo aumento do custo final da produção quando se utilizou TM e T como substratos.

Tabela 8 - Valores em reais para a produção de lipases de *Penicillium corylophilum* em diferentes meios de cultivo em fermentação no estado sólido

Substrato	Atividade U g ⁻¹ S	Valores em reais (R\$)/ 100 g do substrato seco
FSG (144 h)	28,2 ± 3,8	75,41
TM (168 h)	21,5 ± 5,4	73,99
T (168 h)	32,3 ± 5,5	74,49

Fonte: Autoria própria (2021)

De acordo com a análise estatística para a produção de lipases (Figura 6), não houve diferença significativa para a atividade entre os três meios, sendo assim, o sólido fermentado utilizando TM (menor custo) seguido de T, em 168 h seriam adequados para serem empregados em processos em que não há a necessidade de controle de água no fermentado, como por exemplo, reações de hidrólise, seria uma alternativa viável já que o FSG (144 h) mesmo apresentando uma atividade próxima, apresenta custo mais elevado. Ainda assim, levando em consideração o tempo, a fermentação utilizando FSG (144 h) é preferível, visto que reduz a laboração em um dia.

No caso de aplicabilidade que exige a necessidade de controle de água, como reações de esterificação e transesterificação, faz-se necessário o procedimento de liofilização e assim o fermentado obtido a partir do FSG seria a melhor opção, já que dentre os três foi o que perdeu menor atividade (20%) após secagem.

A atividade do sólido fermentado para o meio sem a necessidade de liofilização (Triguilho, 168 h) foi analisada também pelo método titulométrico, utilizando como substrato o óleo de oliva. O objetivo deste ensaio foi confirmar a presença de lipases consideradas “verdadeiras” (Lima, 2004) no sólido fermentado, pois a atividade foi inicialmente realizada com um substrato não-natural para lipases (*p*NPP), o que poderia caracterizar a presença de hidrolases, mas não necessariamente lipases. A atividade lipolítica utilizando o óleo de oliva foi de $97 \pm 11,9$ U g⁻¹ S, confirmando a presença de lipases verdadeiras.

6 CONCLUSÃO

- Foi possível produzir lipases de *Penicillium corylophilum* por fermentação no estado sólido utilizando meios de baixo custo;
- O trigoilho apresentou atividade de $32,3 \pm 5,5 \text{ U g}^{-1}\text{S}$ em 168 horas de cultura, representando a maior produção de lipases, porém a análise estatística indica que não há diferenças significativas em termos de produção para os três meios;
- No processo de liofilização, o sólido fermentado obtido a partir do farelo da semente de girassol (144 h) apresentou os melhores resultados em termos da atividade residual (83,24%). Já o fermentado obtido a partir do trigoilho (168 h) teve maior desnaturação enzimática, com atividade residual de 37%;
- Em relação ao custo-benefício é preciso avaliar necessidade ou não da liofilização;
- Novos estudos utilizando misturas de substratos em proporções distintas serão realizados com a finalidade de diminuir custos e aumentar a produção.

REFERÊNCIAS

- AGUIEIRAS, E.C.G; OLIVEIRA, E.D.C; FREIRE, D.M.G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52-67, jun. 2015.
- ALBANO, M. **Comparação da produção de celulases e xilanases por fungos filamentosos em fermentação submersa e estado sólido**. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Microbiologia Industrial do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2012.
- ALVES, A. M, *et al.* *Penicillium citrinum* whole-cells catalyst for the treatment of lipid-rich wastewater. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, p. 433-438, 2019.
- BAKKER, C. M. C. N. **Avaliação da produção e aplicação de enzimas utilizando resíduo farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido**. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.
- BARON, A. M. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. 2008. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química, Curitiba, 2008.
- BARON, A. M. *et al.* A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 34, p. 25-32, jul. 2005.
- BEVILAQUA, J. V. **Estudo da catálise enzimática em meio orgânico para a produção de protótipo de fármaco antiasmático**. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Química, Rio de Janeiro, 2005.
- BILAL, M. *et al.* Immobilized lipases-based nano-biocatalytic systems — A versatile platform with incredible biotechnological potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.175, p.108-122, fev.2021.
- BORELLI, G. M.; TRONO, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 20774-20840, set. 2015.
- BOSSA, L. F. *et al.* **Resíduos agroindustriais para produção de produtos biotecnológicos**. In: **Agroecologia: caminho de preservação do meio ambiente**, p. 9–25, 2019.
- CAMARGO, L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido**. 2014. 16 f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2015.
- COELHO, G. A. *et al.* Avaliação das variáveis de produção de lipase por *Aspergillus niger* 11T53A14 por fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo e amên-

doa de manga. In: **XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, v. 1, n. 5, 2018.

COELHO, M. A. Z. *et al.* Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **B. CEPPA**, v. 19, n. 1, p. 33-42, jan./jun. 2001.

COLLA, L. M. *et al.* Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 461-467, 2016.

COLLA, L. M.; Reinehr, C. O.; Costa, J. A. V. Aplicações e Produção de Lipases Microbianas. **CIATEC**, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.

CONTESINI, F. J. *et al.* *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 163 – 171, dez. 2010.

Crônicas. Português. In: Bíblia sagrada. São Paulo: Editora Ave-Maria, 2003. p. 1671. Edição Claretiana.

DAMASO, M. C. T. *et al.* Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 676-681, 2008.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, dez. 2015.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2007. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FERNANDES, M. L. M. *et al.* Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, p. 8-13, 2007.

FOUDA, A. *et al.* Optimization of green biosynthesized visible light active CuO/ZnO nano-photocatalysts for the degradation of organic methylene blue dye. **Heliyon**, v. 6, set. 2020.

GARCIA, T. *et al.* Enzymatic synthesis of fatty esters; Part I. kinetic approach. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 7, p. 584-590, 1999.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R.N. Triagem e produção de lipase de organismos fúngicos. **Biocatálise e Biotecnologia Agrícola**, v.14, p. 241-253, 2018.

GÓMEZ-ALARCÓN, G. G.; MUÑOZ, M. L; FLORES, M. Excretion of Organic Acids by Fungal Strains Isolated from Decayed Sandstone. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 34, p. 169-180, 1994.

ISMAIL, A. R.; KASHTOH, H.; BAEK, K. H. Temperature-resistant and solvent-tolerant lipases as industrial biocatalysts: Biotechnological approaches and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, p. 127-142, set. 2021.

JIMÉNEZ, M. A. L.; MARTÍNEZ, R. H. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. **Biotech**, abr. 2017.

JUNIOR, V. T.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. de M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.1, jan./mar. 2006.

KANCHANA, R., MURALEEDHARAN, U.D., RAGHUKUMAR, S. Alkaline lipase activity from the marine protists, thraustochytrids. **World J. Microbiol Biotechnol**, v. 27, p. 2125-2131, 2011.

KEMPKA, A. P. *et al.* Influence of different inductors and operating conditions in the production of lipase from *Aspergillus niger* using cassava peel: a short study. **Engvista**, v. 19, n.1, p. 9-18, 2017.

KUMAR, S. *et al.* 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, p. 4909-4912, 2011.

LI, N.; ZONG, M.H. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. **J. Mol. Catal. B: Enzym**, v. 66, p. 43–54, set. 2010.

LIMA, V.M.G. **Produção e Purificação de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua Aplicação em Biocálise em Solventes Orgânicos**. 2004. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba, 2004.

MELO, A. F. **Produção e Aplicação de Lipase no Desenvolvimento de um Biossensor Potenciométrico**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2012.

MENA, L. P. *et al.* Emprego de ultra-congelamento e liofilização para conservação da enzima β -galactosidase obtida a partir de células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus*. In: **Anais do simpósio latino-americano de ciências de alimentos**, Galoá, Campinas, 2015.

MENDES, A. A. *et al.* Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Quím. Nova**, v. 28, n.2, p. 296-305, 2005.

MENONCIN, S. *et al.* Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 29(2): 440-443, abr.-jun. 2009.

MESSIAS, J. M. *et al.* Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MOUBASHER, A. H.; EL-DOHLOB, S.M. Seasonal fluctuations of Egyptian soil fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 54, p. 45-51, fev. 1970.

- MURUCI, L. N. M. **Produção e caracterização de lipase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação no estado sólido utilizando resíduos da agroindústria.** 2012. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Seropédica, 2012.
- MUSA, H. *et al.* Turning oil palm empty fruit bunch waste into substrate for optimal lipase secretion on solid state fermentation by *Trichoderma* strains. **Process Biochemistry**, v. 63, p. 35-41, 2017.
- OLIVEIRA, A. C. D. *et al.* Production of methyl oleate by direct addition of fermented solid *Penicillium sumatrense* and *Aspergillus fumigatus*. **Renewable Energy**, v. 162, p. 1132-1139, 2020.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PITOL, L. O. *et al.* Optimization studies to develop a low-cost medium for production of the lipases of *Rhizopus microsporus* by solid-state fermentation and scale-up of the process to a pilot packed-bed bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 62, p. 37-47, nov. 2017.
- PRABANINGTYAS, R. K. *et al.* Production of immobilized extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method using palm kernel cake, soybean meal, and coir pith as the substrate. **Energy Procedia**, v.153, p. 242-247, 2018.
- PUTRI, D. N. *et al.* Optimization of *Aspergillus niger* lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. **Energy Reports**, v.6, p. 331-335, ago. 2020.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electron J. Biotechnol.**, v. 1, p. 26-27, 1998.
- REINEHR, C. O. *et al.* Produção de lipases de *aspergillus niger* e *aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Quim. Nova**, v. 37, n. 3, p. 454-460, fev. 2014.
- RIGO, E. *et al.* Improved lipase biosynthesis by a newly isolated *Penicillium* sp. grown on agricultural wastes. **Ind Biotechnol**, v. 5, n. 2, p. 119-126, jun. 2009.
- RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica.** 2006. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Curitiba, 2006.
- ROMERO, C. M. *et al.* Activity and stability of lipase preparations from *Penicillium corylophilum*: potential use in biocatalysis. **Chemical Engineering Technology**, 2014.
- SALIHU, A. *et al.*, Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v.58, p.36-44, 2012.

SALUM, T. F. C. *et al.* Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348-1354, 2010.

SANTOS, P. S. dos. *et al.* Solid-state fermentation in agroindustrial residues for enzymes production: A systematic review. **Engineering na Exact Sciences**, v. 04, n. 2, 2018.

SANTOS, S. F. de M. *et al.* Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1973-1978, nov. 2008.

SERRES, J. D. da S. *et al.* A combined sorption and kinetic model for multiphasic ethyl esterification of fatty acids from soybean soapstock acid oil catalyzed by a fermented solid with lipase activity in a solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 120, p.84-92, 2017.

SINGHANIA, R. R. *et al.* Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, abr. 2009.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid–state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 205-218, mar. 2003.

STUER. W.; JAEGER. K.E.; WINKLER, U.K. Purification of extracellular lipases from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 168, n.3, p. 1070-1074, dez. 1986.

SUN, S.Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for 'whole-cell synthetic lipase' production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 219-224, fev. 2008.

TUKEY, J. W. **The problem of multiple comparisons**. Princeton, NJ: Mimeographs Princeton University, 1953.

UTAMI, T. S. *et al.* Production of dry extract extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method to catalyze biodiesel synthesis. **Energy Procedia**, v. 136, p. 41-46, 2017.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.