



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA

PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Aspergillus niger* 11T53A14
ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
PARA A SÍNTESE DE BIODIESEL

Júlio Cesar Vianna Dutra

Orientadores:

Prof^ª. Dra. Lilian Ferreira de Senna

Prof^ª. Dra. Marta Antunes Pereira Langone

Rio de Janeiro, Agosto, 2007.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Produção de Lipase por *Aspergillus niger* 11T53A14 através
de Fermentação em Estado Sólido para a Síntese de Biodiesel**

JÚLIO CESAR VIANNA DUTRA

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Engenharia Química.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lilian Ferreira de Senna – PPGEQ/UERJ (orientadora)

Prof^a. Dra. Marta Antunes Pereira Langone – PPGEQ/UERJ (orientadora)

Dra. Sonia Couri – Embrapa/Agroindústria de Alimentos

Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa – PPGEQ/UERJ

Dra. Juliana Vaz Bevilacqua – CENPES/Petrobras

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
Agosto – 2007

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

D978 Dutra, Júlio Cesar Vianna
Produção de lipase por *Aspergillus niger* 11T53A14
através de fermentação em estado sólido para a síntese de
biodiesel. / Júlio Cesar Vianna Dutra- 2007
Xviii., 87 f.

Orientadora: Lilian Ferreira de Senna.
Orientadora: Marta Antunes Pereira Langone.
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio
de Janeiro, Instituto de Química.

1. Lipase – Teses. 2. Fermentação – Teses. 3.
Aspergillus niger – Teses. I. Senna, Lilian Ferreira. II.
Langone, Marta Antunes Pereira. III. Universidade do Estado
do Rio de Janeiro, Instituto de Química. IV. Título

CDU 577.15

À minha mãe, Dna. Teresinha de A. Vianna, e ao meu pai, Sr. Ezio Dutra; que foram e sempre serão as pessoas que mais me inspiram nessa vida. Se algum dia eu for metade do ser humano que vocês são, me sentirei realizado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a todas as pessoas que conheci e convivi nesses anos de Mestrado. Todas, sem exceção, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos, Anderson Cesar e Tchelly Cristina pela alegria passada principalmente nos momentos difíceis nesta etapa da minha vida. Mesmo cada um tendo áreas profissionais distintas da minha, ainda assim sempre serão referências tanto pessoais quanto profissionais. O amor em sua forma mais pura é o que sinto por vocês.

À Giselle Gomes, o meu muito obrigado pela pessoa, principalmente amiga, que foi durante a realização desse trabalho. Seu sorriso e suas brincadeiras foram minhas maiores “terapias” e sua melhor demonstração de amor.

A todos os meus familiares e amigos que não são citados, sintam-se abraçados como forma de gratidão.

As minhas amigas e cunhadas Gisllene e Roberta, obrigado sempre. Principalmente agora, com a chegada da Duda.

Às minhas orientadoras Lilian Ferreira de Senna e Marta Antunes Pereira Langone. O valor que vocês representam pra mim jamais poderá ser expresso por palavras. Agradeço pela presença, pelos conselhos, pelas orientações, enfim por todas as atitudes que foram relevantes ao êxito deste trabalho. Mas, acima de tudo, agradeço pela sincera amizade que demonstraram comigo.

À Sônia Couri, pela amizade, pelos ensinamentos, pela ajuda, pelo carinho e orientação constantes. Não existem palavras suficientes para agradecer a você; apenas a me desculpar por não refletir, da forma merecida, o quanto você contribuiu para o surgimento de uma pessoa melhor.

À Juliana Vaz Bevilaqua por toda a ajuda, interferência e observações nesta tese. Obrigado pela confiança e suporte.

Às amigas Selma da Costa Terzi e Ana Carolina Pereira de Oliveira, pelos ensinamentos e conselhos, pelas conversas e pelas palavras de incentivo. A ajuda de vocês foi de destaque em muitas análises e procedimentos. Obrigado.

À Mônica Caraméz Trichez Damaso, uma pessoa a qual qualquer adjetivo ou palavra de agradecimento ficam pobres e sem sentido.

Ao meu grande “irmão” William Ferreira Leal Júnior, uma das melhores pessoas que conheci, e por isso se tornou meu grande amigo. Obrigado por todos os momentos de risos.

Aos funcionários Flávia Gomes, Cláudio Souza da Silva (Claudão), Sérgio Macedo Pontes (Filé), Luiz Fernando (Chorão), pela amizade e pela prazerosa convivência que tivemos na Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Aos estagiários que conviveram comigo, tanto na Embrapa – Agroindústria de Alimentos, quanto na Uerj. Obrigado pela ajuda e pelos momentos de descontração. Peço que me desculpem, mas todos vocês têm a mesma importância e por serem muitos, seriam necessárias muitas páginas para nomear a todos.

Ao Jonas, técnico do laboratório de microscopia da Uerj, obrigado pela ajuda e gentileza.

Ao amigo Otávio Bernardes pela grande ajuda na realização da produção do biodiesel pela enzima imobilizada.

À Dra. Denise Maria Guimarães Freire pela imobilização da enzima.

À Embrapa Agroindústria de Alimentos e a Uerj por terem fornecido os recursos necessários para a execução desta dissertação.

Gostaria de agradecer a cada autor referenciado nesta dissertação. Todos se tornaram meus conselheiros. Obrigado, e certamente lutarei para que no futuro possa contribuir com a pesquisa, de mesma forma que os senhores o fizeram.

À Universidade Cooperativa da Petrobrás, pelo apoio financeiro neste projeto.

A Deus, ou qualquer outro nome que possa ser lembrado para a mentalização e meditação. Não importa a doutrina e sim o objetivo que sua energia representa. Agradeço por todas as provas e ensinamentos que tenho passado durante todos os anos da minha vida. Agradeço aos meus mentores e aos meus “pais”, por estarem ao meu lado travando e vencendo essa demanda.

RESUMO

Este trabalho investigou as melhores condições para a produção de lipase por *Aspergillus niger* 11T53A14 em fermentação em estado sólido (FES). A cepa de *A. niger* 11T53A14 foi cultivada em FES usando como suporte farelo de trigo enriquecido com sulfato de amônio 0,91% m/v. Diferentes óleos (mamona, milho, soja, oliva e palma) foram testados como fontes de carbono suplementares para aumentar a produção de lipase, avaliando-se também as condições de umidade e concentração da fonte de carbono suplementar no meio fermentativo. O máximo valor de atividade enzimática foi obtido usando 2% m/m de óleo de mamona e 60% de umidade. Empregando estas condições, a fermentação em estado sólido foi realizada em placas de Petri. O crescimento da biomassa foi avaliado a cada 24 horas durante cinco dias através da medição da área total ocupada pelas hifas utilizando processamento digital de imagens. As imagens foram adquiridas usando um estereomicroscópio acoplado a uma câmera digital e os resultados foram processados utilizando o *software* KS400. O teor de glicosamina na parede celular do fungo e a atividade de lipase também foram quantificados a fim de comparação com os valores de área mensurados. Os resultados indicaram uma correlação de aproximadamente 0,98 entre os dados de área de crescimento e de teor de glicosamina, e 0,92 entre a área medida por processamento de imagens e a atividade de lipase, comprovando que a técnica proposta pode ser usada como método indireto de estimativa da biomassa na FES. Adicionalmente, a atividade de esterificação da lipase imobilizada foi determinada a partir da síntese de oleato de butila, em meio com e sem hexano (50% v/v), obtendo-se 650 U/g e 120 U/g, respectivamente. A lipase imobilizada também foi empregada na reação de transesterificação entre óleo de soja e etanol e o rendimento máximo em biodiesel obtido foi de 2,4% após 30 minutos de reação.

Palavras-chave: fermentação em estado sólido, lipase, glicosamina, processamento digital de imagens, óleo de mamona, *Aspergillus niger*

ABSTRACT

This study investigated the best conditions to produce lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation (SSF). The strain *A. niger* 11T53A14 was cultivated in SSF using wheat bran as support, enriched with 0.91% m/v of ammonium sulfate. To enhance lipase production, several oils (castor, soybean, olive, corn, and palm) were investigated as supplementary carbon sources, as well as the fermentation medium moisture and concentration of the supplementary carbon source. The maximum lipase activity was obtained using 2% m/m of castor oil and moisture of 60%. Using these conditions, the solid-state fermentation was carried out in Petri dish. The growth was evaluated every 24 hour during five days by measuring the total area occupied by the hyphae using digital image processing. Images were acquired using a stereomicroscope coupled with a digital camera and the results were processed using the software KS400. The glycosamine content and the lipase activity were also determined to be correlated with the measured area. Results indicated a correlation of approximately 0.98 between the growing area and glycosamine content data. A correlation of 0.92 between the area measured by image processing and the lipase activity was also determined, showing that the digital image process technique can be used to monitor the biomass growth in a SSF process as well as to correlate biomass growth and enzyme activity. Additionally, the immobilized esterification lipase activity was determined for the butyl oleate synthesis with and without hexane (50% v/v), resulting in 650 U/g and 120 U/g respectively. The enzyme was also used for transesterification of soybean oil and ethanol with maximum yield of 2.4% after 30 minutes of reaction.

Keywords: solid state fermentation, lipase, glycosamine, digital image processing, castor oil, *Aspergillus niger*

SUMÁRIO

1 – Introdução	01
2 – Revisão bibliográfica	04
2.1 – Lipase	04
2.2 – Ativação interfacial	04
2.3 – Características da lipase	05
2.4 – Especificidade das lipases	05
2.5 – Aplicação das lipases	06
2.6 – Biocatálise em meio orgânico microaquoso	06
2.7 – Reações em meio orgânico microaquoso catalisadas por lipases	06
2.8 – Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais com álcoois utilizando lipases	08
2.9 – Produção de lipases	09
2.9.1 – Fontes	09
2.9.2 – Fermentação em estado sólido	11
2.10 – Monitoramento do crescimento da biomassa em fermentação em estado sólido	17
2.10.1 – Método químico: quantificação da glicosamina	17
2.10.2 – Processamento digital de imagens	18
3 – Objetivos	22
3.1 – Objetivos gerais	22
3.2 – Objetivos específicos	22
4 – Materiais e Métodos	23
4.1 – Microrganismo	23
4.2 – Meios de cultura	23
4.2.1 – Meio básico	23
4.2.2 – Meio de sabugo de milho (MSM)	25
4.3 – Preparo e quantificação do inóculo	26
4.4 – Processo de fermentação em estado sólido (FES)	26
4.4.1 – Seleção da fonte de carbono	26
4.4.2 – Influência da concentração de óleo de mamona e do teor de umidade na produção de lipase	27

4.4.3 – Monitoramento do crescimento da biomassa	28
4.4.3.1 – Aquisição e processamento de imagens	29
4.4.3.2 – Determinação do teor de glicosamina	33
4.4.4 – Determinação da atividade da lipase	34
4.4.5 – Imobilização da lipase produzida	36
4.4.6 – Determinação da atividade de esterificação da lipase imobilizada	36
4.4.7 – Produção de biodiesel utilizando lipase imobilizada	37
4.4.8 – Análise cromatográfica	38
4.5 – Análise da atividade de água (Aw) e da umidade do meio de fermentação	38
4.6 – Análises estatísticas	39
5 – Resultados e Discussões	40
5.1 – Influência do teor de umidade na produção de lipase	40
5.2 – Influência da fonte de carbono suplementar na produção de lipase	43
5.3 – Monitoramento do crescimento da biomassa	46
5.3.1 – Processamento digital de imagens	46
5.3.2 – Determinação do teor de glicosamina	52
5.3.3 – Determinação da atividade enzimática da lipase	54
5.3.4 – Comparação entre os métodos de quantificação da biomassa	56
5.4 – Determinação da atividade de esterificação da lipase imobilizada de <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14	59
5.5 – Produção de biodiesel utilizando lipase imobilizada de <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14	61
6 – Conclusões	64
7 – Sugestões	65
8 – Referências bibliográfica	66

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 2.1 – Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos	12
Figura 2.2 – Reator em colunas de vidro para fermentação em estado sólido	15
Figura 2.3 – Representação esquemática da estrutura Química da molécula de N-acetil-glicosamina	17
Figura 4.1 – Reator de colunas de vidro com banho termostático	28
Figura 4.2 – Fluxograma da sub-rotina adotada para o procedimento de análise digital de imagens	31
Figura 4.3 – Crescimento do fungo <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14 em 24 horas	31
Figura 4.4 - Realce dos contornos da imagem original com o uso de um filtro passa-alta	32
Figura 4.5 – Binarização de uma imagem, visando a separação entre as hifas do fungo e o farelo de trigo através de um filtro limitador fixo	32
Figura 4.6 - Segmentação das hifas a serem quantificadas no processamento, através de uma método de afinamento	33
Figura 5.1 – Influência do teor de umidade na produção de lipase por fermentação de <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14 em farelo de trigo	41
Figura 5.2 – Variação do teor de umidade no meio de fermentação em estado sólido em placas ao longo do tempo de 96 horas	42
Figura 5.3 – Variação da atividade de água no meio de fermentação em estado sólido em placas ao longo do tempo de 96 horas	42
Figura 5.4 – Efeito da adição de diferentes fontes suplementares de carbono na produção de lipase de <i>A. niger</i> 11T53A14 por fermentação em estado sólido	43
Figura 5.5 – Efeito da concentração de óleo de mamona na produção de lipase de <i>A. niger</i> 11T53A14 por fermentação em estado sólido	45
Figura 5.6 – Imagem original adquirida no tempo zero da fermentação	

em estado sólido pelo microrganismo <i>A. niger</i> 11T53A14	47
Figura 5.7 – Realce dos contornos da imagem da Figura 6.6, através de um filtro passa-alta	47
Figura 5.8 – Quantificação da biomassa de <i>A. niger</i> 11T53A14 no tempo zero através de um método de afinamento	47
Figura 5.9 - Imagem original aqusitada do crescimento do fungo <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14 em fermentação em estado sólido no tempo de 24 horas	47
Figura 5.10 - Realce dos contornos da imagem 5.9, através de um filtro passa-alta	48
Figura 5.11: Quantificação da biomassa de <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14 crescida em 24 horas de fermentação em estado sólido	48
Figura 5.12: Imagem original aqusitada do fungo <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14 em fermentação em estado sólido após 48 horas de crescimento	48
Figura 5.13: Realce dos contornos da imagem 5.12 através de um filtro passa-alta	48
Figura 5.14: Quantificação da biomassa de <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14 crescida após 48 horas de fermentação em estado sólido	49
Figura 5.15: Imagem original aqusitada do fungo <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14 em fermentação em estado sólido após 72 horas de crescimento	49
Figura 5.16: Realce dos contornos da imagem 5.15 através de um filtro passa-alta	49
Figura 5.17: Quantificação da biomassa de <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14 crescida após 72 horas de fermentação em estado sólido	49
Figura 5.18: Imagem original aqusitada do fungo <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14 em fermentação em estado sólido após 96 horas de crescimento	50

Figura 5.19: Realce dos contornos da imagem 5.18 através de um filtro passa-alta	50
Figura 5.20: Quantificação da biomassa de <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14 crescida após 96 horas de fermentação em estado sólido	50
Figura 5.21: Análise estatística da área de crescimento do fungo <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14 em fermentação em estado sólido com óleo de mamona (2% m/m), onde p é o valor de significância e ns é um valor não significativo	51
Figura 5.22: Análise estatística da determinação do teor de glicosamina presente no fungo <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14, crescido em meio sólido contendo óleo de mamona (2% m/m) por 96 horas	53
Figura 5.23: Análise estatística da atividade enzimática da lipase produzida pelo fungo <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14 através da fermentação em estado sólido, utilizando óleo de mamona (2% m/m) como fonte suplementar de carbono	54
Figura 5.24: Correlação entre a metodologia do processamento digital de imagens e a determinação do teor de glicosamina	56
Figura 5.25: Correlação entre a atividade enzimática da lipase e os métodos de quantificação indireta da biomassa pela determinação do teor de glicosamina e o processamento digital de imagens	58
Figura 5.26: Conversão de ácido oléico na reação de esterificação	

entre ácido oléico e butanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e lipase (3% m/m), a 45°C , em meio com e sem hexano (50% v/v), comparada a conversão pela lipase comercial. 60

Figura 5.27: Produção de biodiesel utilizando razão molar etanol/óleo de soja igual a 3, com adição escalonada do etanol , 7% m/m de lipase imobilizada, a 40°C, comparada à produção por uma lipase comercial. 63

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 2.1 – Especificidade de algumas lipases	05
Tabela 2.2: Alguns fungos produtores de lipases	10
Tabela 2.3: Comparações entre os processos fermentativos em estado sólido e submerso	13
Tabela 4.1: Composição do meio básico SOCAREAN	24
Tabela 4.2: Composição do meio de sabugo de milho	25
Tabela 4.3: Composição do meio de fermentação	27

1- Introdução

O número de enzimas que é usado na biocatálise e que se tornou comercialmente disponível tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Isto é, principalmente, devido às hidrolases e, particularmente, para enzimas extracelulares tais como as lipases. Das enzimas existentes, lipases e proteases são, do ponto de vista catalítico, as enzimas mais estudadas e suas especificidades em relação ao substrato já são bem compreendidas (STRAATHOF e ADLERCREUTZ, 2000).

Lipases são enzimas usadas para catalisar reações de hidrólise de triglicerídeos, mas também tem sido descoberto que essas enzimas também podem ser usadas como catalisadores de reações de esterificação e de transesterificação. Biocompatibilidade, biodegradabilidade e aceitabilidade ambiental dos processos biotecnológicos utilizando lipases são propriedades desejáveis na maioria das aplicações industriais (MARCHETTI et al., 2007).

As estruturas e aplicações das lipases em biocatálise já são bem documentadas. Essas enzimas são particularmente úteis desde que elas apresentam uma considerável resistência à desnaturação pelo solvente e podem ser usadas em (praticamente) meios anidros e, acima de tudo, podem ser adquiridas sem custo elevado (STRAATHOF e ADLERCREUTZ, 2000).

A reação de transesterificação entre óleos vegetais e álcoois de cadeia curta, visando a produção de biodiesel, empregando lipases vem sendo bastante estudada nos últimos anos (BERNARDES et al., 2007; DOSSAT et al., 2002; FUKUDA et al., 2001; ISO et al., 2001; KÖSE et al., 2002; SHIMADA et al., 1999; SHIMADA et al., 2002; SOUMANOU e BORNSCHEUER, 2003; SRIVASTAVA e PRASAD, 2000). Biodiesel é definido como uma mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, preferencialmente ésteres metílicos e etílicos, provenientes de fontes renováveis, como óleos vegetais.

O processo industrial de produção de biodiesel consiste no aquecimento de óleos vegetais com um excesso de álcool (metanol ou etanol), na presença de catalisadores inorgânicos (NaOH, KOH). A grande desvantagem do processo químico convencional é que os catalisadores não podem ser reutilizados após o término da reação, tornando a etapa de purificação do glicerol, subproduto da reação, mais difícil (MA e HANNA, 1999). Portanto, uma rota alternativa para a produção de biodiesel é

a reação de transesterificação de óleos vegetais com álcoois de cadeia curta utilizando lipases.

No entanto, um dos obstáculos para utilização de enzimas em processos industriais é o custo do biocatalisador. No Brasil, isso ocorre porque o consumo de enzimas ainda é incipiente. O mercado brasileiro de enzimas é de US\$ 40 milhões e, assim, o país participa com apenas 2,7% do mercado mundial. As vendas anuais de lipases correspondem apenas a cerca de US\$ 20 milhões, representando 3,3% no mercado mundial de enzimas (BON e PEREIRA Jr., 1999).

Como alternativa à utilização de lipases comerciais imobilizadas para a síntese de biodiesel, este trabalho visou estudar a produção de lipases, a partir da seleção de microrganismos da coleção de fungos da Embrapa Agroindústria de Alimentos, por fermentação em estado sólido. A fermentação em estado sólido apresenta algumas desvantagens relacionadas aos maiores riscos de contaminação, às necessidades de espaço e às dificuldades de controle operacional. Por outro lado, apresenta vantagens quanto à transferência de oxigênio e à recuperação de produto, maior produtividade volumétrica, além da possibilidade da utilização de sub-produtos agroindustriais como suporte ou até mesmo como substrato do processo fermentativo (SATO & SUDO, 1999; PANDEY, 2003; COUTO & SANROMÁN, 2006).

Avanços tecnológicos vêm sendo gradualmente incorporados a esse processo, podendo torná-lo interessante para países que dispõem de resíduos agroindustriais de baixo custo, tais como o Brasil.

Adicionalmente, o estudo de métodos de estimativa de crescimento da biomassa, relacionando a cinética de crescimento, a morfologia do microrganismo e a produtividade, pode fornecer parâmetros importantes para melhorar a operação de um processo fermentativo. Entretanto, na fermentação em estado sólido esta estimativa torna-se mais complexa, pela dificuldade em separar o meio de cultura da biomassa, e ainda, pela imprecisão, pouca sensibilidade e baixa velocidade de estimação dos métodos tradicionais. Dentre as novas tecnologias empregadas para facilitar o controle na fermentação em estado sólido, através do monitoramento do crescimento microbiano, destaca-se o processamento digital de imagens.

Assim sendo, torna-se relevante estudar a produção de novas lipases por fermentação em estado sólido, acompanhando o crescimento microbiano por análise digital de imagem, e avaliar o potencial do biocatalisador em reações de esterificação e de transesterificação.

Desse modo, no Capítulo 2 será apresentada uma revisão bibliográfica sobre o tema proposto, com ênfase em fermentação em estado sólido, produção de lipases, processamento digital de imagens e produção de biodiesel por via enzimática. Os objetivos gerais e específicos deste trabalho serão mostrados no Capítulo 3, enquanto que os materiais e a metodologia utilizada para o desenvolvimento do presente estudo estarão destacados no Capítulo 4. No Capítulo 5 serão apresentados os resultados encontrados, bem como as discussões correspondentes e o Capítulo 6 mostrará as conclusões obtidas com o trabalho desenvolvido. Sugestões de continuação desse estudo estarão descritas no Capítulo 7, sendo as referências bibliográficas empregadas para a elaboração desta dissertação dispostas no Capítulo 8.

3 – Objetivos

3.1 – Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi produzir lipase por fermentação de *Aspergillus niger* 11T53A14 em estado sólido, monitorando o crescimento do microorganismo por método químico e por processamento digital de imagens, e verificar o potencial da lipase produzida na síntese de biodiesel.

3.2 – Objetivos específicos

- Investigar a produção de lipase por um fungo filamentosos (*Aspergillus niger* 11T53A14), selecionado da coleção de fungos da Embrapa Agroindústria de Alimentos.
- Investigar os efeitos do teor de umidade e da adição de fonte suplementar de carbono na produção de lipase por fermentação de *Aspergillus niger* 11T53A14 em estado sólido.
- Monitorar o crescimento microbiano, na fermentação em estado sólido, por análise química (método da glicosamina) e por processamento digital de imagens.
- Utilizar a lipase produzida na síntese de biodiesel a partir da reação de transesterificação de óleo de soja com etanol.

2 – Revisão bibliográfica

2.1 – Lipase

As lipases são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases (glicerol éster hidrolase E.C. 3.1.1.3) e biologicamente são desenvolvidas para catalisarem as reações de hidrólise, já que o ambiente natural das células é rico em água. A água desempenha a função de dispersar a molécula da enzima, atuando como um co-substrato na reação de hidrólise de triglicerídeos. A hidrólise de triglicerídeos utilizando lipases é uma reação reversível e, portanto, o equilíbrio pode ser alterado no sentido da síntese de éster pela redução da atividade de água (HOU, 2005; PAIVA *et al.*, 2000; SVENDSEN, 2000). No entanto, o meio não deve ser totalmente anidro, e sim conter uma quantidade mínima de água suficiente para manter a atividade da enzima. Isto quer dizer que este teor de umidade, mesmo sendo baixo, é necessário para atuar como componente primário do microambiente e como um tampão entre a enzima e a reação (LEE & AKOH, 1998).

2.2 – Ativação interfacial

Enzimas, incluindo as lipases, têm atividade específica em ambientes aquosos com grupos polares e grupos apolares. Diferentemente de outras enzimas, a natureza da reação catalisada pela lipase é muito complexa devido à insolubilidade dos substratos lipídicos na água. A água é necessária para manter e ativar a enzima formando uma interface no meio reacional devido à presença de lipídios imiscíveis. A atividade catalítica das lipases é sensivelmente diminuída na ausência de uma interface.

Na reação de hidrólise, as lipases atuam na interface óleo/água de emulsões e algumas propostas são usadas para explicar sua capacidade de atuação nesse meio reacional, tais como: a) uma enzima mais ativa sendo gerada por uma mudança conformacional induzida interfacialmente, isto é explicado pelo fato de que os sítios de adsorção na interface não são sítios ativos onde ocorre a reação, assim sendo, ao entrar em contato com a interface a lipase assume uma nova conformação espacial, b) uma maior concentração de substrato no local, c) uma orientação mais favorável do substrato, d) um grau menor de hidratação do substrato pode tornar as enzimas mais ativas, já que as moléculas de água podem formar uma proteção às ligações ésteres (D'AGOSTINI, 2001; LANGONE, 1998).

2.3 – Características das lipases

Dependendo de sua origem, as lipases podem apresentar pesos moleculares que variam de 20 a 75 kDa. Em geral, a faixa de temperatura ótima para a atividade enzimática da lipase fica entre 30°C e 40°C, contudo algumas lipases têm mostrado níveis de estabilidade consideráveis mesmo em temperaturas extremas, como 5°C e 60°C. O mesmo é observado em relação ao pH, onde as lipases apresentam uma ampla faixa de atuação, variando entre 5,0 a 8,0 (KAMINI *et al.*, 1998; BENJAMIM & PANDEY, 2001; PASTORE *et al.*, 2003).

2.4 – Especificidade das lipases

Uma característica importante da lipase é a especificidade, sendo dividida em quatro classes a serem definidas: a) especificidade em relação a classe de lipídio ou ao tipo de éster, como por exemplo tri-, di- ou monoglicerídeo, colesterol éster, metil éster, entre outros; b) a regioespecificidade, que representa a especificidade em relação à posição de ligação éster numa molécula, isto é, seletividade em relação à molécula acil localizada na posição sn-1 (e sn-3) da estrutura do glicerol versus a posição secundária (sn-2) da estrutura ; c) especificidade em relação ao resíduo de ácido graxo, na qual a lipase é específica em relação ao comprimento da cadeia ou em relação à presença de dupla ligação na cadeia desse ácido; e d) estereoespecificidade (ou enantioseletividade) que está relacionada à capacidade da lipase em discriminar estereoisômeros, catalisando apenas a hidrólise ou a esterificação de um dos dois estereoisômeros (D'AGOSTINI, 2001; DE CASTRO *et al.*, 2004; VAN DER PADT, 1993 *apud* VIEIRA, 2005). A Tabela 2.1 apresenta alguns exemplos de lipases e suas especificidades (D'AGOSTINI, 2001).

Tabela 2.1: Especificidade de algumas lipases

Especificidade	Lipase (fonte)
Mono- e diacilgliceróis	<i>Penicillium camembertii</i>
Triacilgliceróis	<i>Penicillium sp.</i>
Regioespecíficas	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Candida antarctica</i> , <i>Penicillium expansum</i>
Específicas em relação ao ácido graxo	<i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Fusarium solani</i>

Fonte: D'AGOSTINI, 2001.

2.5 – Aplicação das lipases

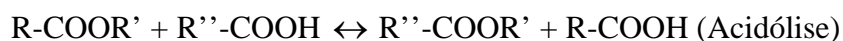
Devido a sua versatilidade e desempenho catalítico, o interesse pela aplicação industrial da lipase tem aumentado, sendo utilizada em diversas aplicações, como por exemplo, no processamento de óleos e gorduras (DE CASTRO *et al.*, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2006); na formulação de detergentes (DE CASTRO *et al.*, 2004); no processamento de alimentos (COUTO & SANROMÁN, 2006); nos processos de síntese usados em indústrias de química fina e farmacêutica (BEVILAQUA, 2005); na indústria de papel, (JAEGER & REETZ, 1998); e atualmente na indústria petroquímica (NOUREDDINI *et al.*, 2005; MEHER *et al.*, 2006).

2.6 – Biocatálise em meio microaquoso

A catálise enzimática era considerada um processo viável somente em fase aquosa. No entanto, nos últimos trinta anos, pesquisas demonstraram que as enzimas podem ser ativas em solventes orgânicos. Uma das principais vantagens da catálise enzimática em meio orgânico é a possibilidade de efetuar reações que utilizam substratos pouco solúveis em água. Desta forma, reações de esterificação e de transesterificação, catalisadas por lipases, podem ser viáveis industrialmente.

Reações com biocatalisadores em meio orgânico são constantemente estudados em áreas interdisciplinares, como a química orgânica, a bioengenharia, e a oleoquímica, para a síntese ou a conversão de lipídios, sacarídeos, peptídeos e polímeros.

As lipases podem realizar várias reações em sistemas microaquosos como a esterificação, interesterificação, acidólise e a alcólise.



2.7 – Reações em meio microaquoso catalisadas por lipases

Para se aplicar um sistema reacional com solvente, deve se escolher um solvente orgânico apropriado antes de executar uma reação enzimática. Pesquisas têm sido realizadas nas últimas duas décadas, constatando um progresso na compreensão das

propriedades das enzimas em meio orgânico, e o quanto os solventes orgânicos podem influenciá-las.

A natureza do solvente orgânico é um fator importante a ser considerado na catálise enzimática em meio microaquoso, pois o solvente não apenas afeta a atividade e a estabilidade da enzima, como também modifica a sua especificidade.

Os solventes menos nocivos às enzimas são aqueles mais hidrofóbicos (que não têm afinidade pela água), pois interagem menos com a água necessária para o funcionamento da enzima. Solventes hidrofílicos (que têm afinidade pela água) tendem a retirar a água essencial das proximidades da enzima, acarretando na perda da atividade enzimática.

Um dos critérios utilizados para determinação da hidrofobicidade do solvente é baseado no $\log P$, sendo P o coeficiente de partição do solvente em uma mistura octanol/água. A biocatálise de reações de síntese, tais como as reações de esterificação, é geralmente considerada possível em solventes imiscíveis em água que apresentam $\log P$ maior do que 4.

Acredita-se que nenhuma atividade catalítica seja possível quando o $\log P$ é menor que 2. O comportamento de solventes não pode ser generalizado para valores intermediários de $\log P$. No entanto, exceções a esta regra têm sido descritas e reações em solventes miscíveis em água têm sido relatadas (CARTA et al., 1992). Os solventes com $\log P$ maior que 4 permitem expressar melhor atividade catalítica da maioria das enzimas, o que pode ser explicado parcialmente pela capacidade dos solventes hidrofílicos em remover a água associada à enzima, que é essencial para a biocatálise (ILLANES, 1994).

Com o objetivo de usar lipases de forma mais econômica e eficiente em meios microaquosos e em solventes orgânicos anidros, técnicas para sua modificação têm sido objeto de estudo de crescente interesse. Estas técnicas podem ser convenientemente classificadas em três categorias principais: modificação química, modificação física (imobilização) e engenharia genética. A modificação é executada para aumentar sua atividade, seletividade ou estabilidade e melhorar sua solubilidade em solventes orgânicos (VILLENEUVE et al., 2000).

As lipases imobilizadas apresentam várias aplicações industriais. Possuem grande estabilidade em alta temperatura, numa ampla faixa de pH, fácil manuseio, uso repetido e possibilidade de operação em sistemas contínuos. Enzimas imobilizadas geralmente possuem melhor performance catalítica em meio microaquoso. De acordo com Shah e

Gupta (2007), isto provavelmente se deve a maior área superficial da preparação do biocatalisador na forma imobilizada.

2.8 – Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais com álcoois utilizando lipases

Biodiesel é definido como ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, isto é, uma mistura de ésteres lineares, preferencialmente ésteres metílicos ou etílicos, de ácidos graxos, obtidos de fontes renováveis como óleos vegetais ou gorduras animais, sendo um combustível renovável, biodegradável e ambientalmente correto (SHAH & GUPTA, 2007; ZENG *et al.*, 2006; SALIS *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2005).

Atualmente, a produção de biodiesel, no mundo, em larga escala, é realizada pela reação de transesterificação de óleo vegetal com metanol empregando catalisador químico alcalino. Existem várias desvantagens associadas a este processo, tais como: os catalisadores não podem ser reutilizados após o término da reação, uma vez que são removidos juntamente com o glicerol, tornando a etapa de purificação deste subproduto mais difícil. Além disso, os óleos e as gorduras utilizados devem possuir baixo teor de ácidos graxos livres (inferior a 1%), o que acarreta na utilização de óleos refinados, que são mais caros. Desta forma, o custo associado aos óleos vegetais e às gorduras utilizados é relativamente alto e constitui 80% do custo total da produção de biodiesel. Outro inconveniente é a ocorrência da reação parcial de saponificação em meio alcalino em presença de água e de ácidos graxos livres.

A utilização de lipases como biocatalisadores representa uma alternativa aos catalisadores alcalinos no processo de obtenção de biodiesel, pois atuam em condições brandas de temperatura e pressão, diminuindo os custos com a energia necessária ao processo, são catalisadores altamente seletivos e, devido às novas técnicas de imobilização e ao avanço da engenharia genética, podem ser utilizadas na forma imobilizada em processos industriais de forma similar aos catalisadores químicos heterogêneos, podendo ser reutilizadas. Atualmente, muitos estudos sobre produção de biodiesel a partir da reação de transesterificação de óleos vegetais usando lipases imobilizadas estão sendo realizados (SHAH e GUPTA, 2007; RATHORE e MADRAS, 2007; MARCHETTI *et al.*, 2007; SHIMADA *et al.*, 2002). Cabe ressaltar que esses biocatalisadores podem representar uma solução para os problemas mencionados quando da utilização de catalisadores homogêneos. Em particular, o subproduto glicerol pode ser facilmente removido sem

demandar qualquer processo complexo de separação. Ademais, ácidos graxos livres contidos em óleos são completamente convertidos a alquil ésteres (SHAH & GUPTA, 2007; ZENG *et al.*, 2006; SALIS *et al.*, 2005).

Vários estudos sobre a produção do biodiesel por via enzimática utilizando lipases imobilizadas vêm sendo realizados.

Watanabe e colaboradores (2001) utilizaram óleo residual, metanol e lipase de *Candida antarctica* imobilizada para a produção de biodiesel, e observaram que a atividade da enzima permaneceu constante durante 100 dias de reação. Shimada e colaboradores (2002) investigaram a produção enzimática de biodiesel e destacaram a dificuldade na reutilização da enzima ao final do processo, visto que o metanol insolúvel inativa irreversivelmente a enzima, mesmo que imobilizada. Em seus experimentos, os autores obtiveram um rendimento em biodiesel, a partir de metanólise de um óleo residual, superior a 90%.

Shah e Gupta (2007) avaliaram a produção de biodiesel a partir de óleos não comestíveis na Índia com etanol não purificado, o que diminui os custos da produção do combustível, para desenvolver uma tecnologia sustentável. Para esta reação, a lipase de *Pseudomonas cepacia* foi escolhida como biocatalisador.

A utilização de lipases para a produção industrial de biodiesel ainda é inviável devido ao elevado custo da enzima. A variedade de aplicações e o aumento crescente do mercado de lipases em reações de síntese incentivam a busca de novas lipases, a partir da seleção de microorganismos e da redução dos custos de processo, pela utilização de resíduos agroindustriais, por exemplo (SHAH e GUPTA, 2007). Vários trabalhos investigam a produção de lipases, capazes de catalisar a reação de transesterificação de óleos vegetais com álcoois de cadeia curta, a partir do cultivo de diversos microorganismos por processos fermentativos (submerso ou sólido) visando minimizar o custo do processo para viabilizar a sua aplicação industrial (SHAH & GUPTA, 2007; PETKAR *et al.*, 2006; SHIMADA *et al.*, 2002; WATANABE *et al.*, 2001).

2.9 – Produção de lipases

2.9.1 – Fontes

As lipases podem ser obtidas de diferentes fontes. Inicialmente, as lipases obtidas eram de origem animal, extraídas do pâncreas de animais e utilizadas como auxiliar digestivo para o consumo humano, estando relacionadas com a digestão de gorduras e a

mobilização dos triacilgliceróis armazenados no organismo (D'AGOSTINI, 2001). As lipases de origem vegetal são encontradas nas sementes de algodão, em cereais, como por exemplo o milho, e na soja.

Entretanto, nas últimas décadas, o interesse pelas lipases de origem microbiana tem aumentado, por elas possuírem características catalíticas mais versáteis (COURI *et al.*, 2006a), maior especificidade por serem provenientes de linhagens microbianas selecionadas e menor tempo de produção.

As lipases podem ser obtidas a partir da cultura de bactérias e leveduras, entretanto, são os fungos filamentosos seus melhores produtores. Os gêneros mais utilizados para o processo de obtenção de lipases são os *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Geotrichum* (COURI *et al.*, 2006a; LI *et al.*, 2006; DE CASTRO *et al.*, 2004; BENJAMIN & PANDEY, 2001; MURALIDHAR *et al.*, 2001; DALMAU *et al.*, 2000).

Fungos filamentosos são microrganismos eucarióticos que se reproduzem por meio de esporos sexuais ou assexuais. Sua estrutura é composta por filamentos tubulares denominados hifas e o conjunto dessas hifas é chamado micélio.

Os fungos filamentosos são os microrganismos mais adequados para culturas em meios com baixo teor de umidade, tais como os meios empregados nas técnicas de fermentação em estado sólido. Na Tabela 2.2 são apresentados alguns fungos produtores de lipase.

Tabela 2.2: Alguns fungos produtores de lipases

Fungos	Substratos	Referência
<i>Aspergillus Níger</i>	Farelo de trigo, torta de óleo de gergelim.	COURI <i>et al.</i> , 2006a; KAMINI <i>et al.</i> , 1998 MAHADIK <i>et al.</i> , 2002
<i>Penicillium restrictum</i>	Torta de óleo de babaçu, torta de azeite de oliva.	CASTILHO <i>et al.</i> , 2000
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Torta de óleo de babaçu, bagaço de cana de açúcar.	CAVALCANTI <i>et al.</i> , 2005
<i>Rhizopus rhizopodiformis</i>	Torta de azeite de oliva, bagaço de cana de açúcar.	CORDOVA <i>et al.</i> , 1998

Continuação da Tabela 2.2

<i>Rhizopus oligosporous</i>	Farelo de trigo, farelo de arroz, bagaço de cana de açúcar, torta de óleo de coco.	UL-HAQ <i>et al.</i> , 2002
------------------------------	--	-----------------------------

2.9.2 – Fermentação em estado sólido

A maioria dos trabalhos sobre a produção de lipases a partir de bactérias, fungos e leveduras tem sido realizada em fermentação submersa. Contudo, atualmente, tem se verificado um crescente interesse na utilização de rejeitos de processos industriais para a produção de lipases em fermentação em estado sólido (FES) (COUTO & SANROMÁN, 2006).

A fermentação em estado sólido pode ser definida como o processo fermentativo que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre onde o crescimento microbiano e a formação de produto ocorrem na superfície do substrato. O substrato deve possuir umidade suficiente para dar suporte ao crescimento e sustentabilidade ao metabolismo microbiano (GERMANO, 2000; PANDEY, 2003).

No processo de fermentação em estado sólido, alguns aspectos importantes devem ser considerados, como a seleção do microrganismo, a estimativa de crescimento da biomassa, a otimização dos parâmetros do processo, a recuperação e purificação do produto (PANDEY, 2003).

Os microrganismos mais adequados para a fermentação em estado sólido são os fungos e as leveduras, já que as bactérias exigem um meio com uma grande atividade de água. Fungos filamentosos são espécies facilmente cultivadas em FES, no entanto, algumas bactérias têm sido reportadas em processos de fermentação em estado sólido (CORZO & REVAH, 1999; PANDEY, 2003).

Na FES, a água apresenta um papel primordial, pois é responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular. Além disso, a presença ou ausência da água afeta significativamente a taxa de crescimento microbiano, a evolução da germinação, esporulação e atividade metabólica das colônias, uma vez que se a quantidade de água não for suficiente para manter as propriedades funcionais de algumas enzimas, a perda da atividade enzimática pode levar ao desequilíbrio na cadeia metabólica das células (GERVAIS & MOLIN, 2003; PANDEY, 2003; HÖLKER & LENZ, 2005; COUTO & SANROMÁN, 2006).

Outro aspecto importante para a fermentação em estado sólido é a seleção de um substrato apropriado ao desenvolvimento do microrganismo. O material sólido não solúvel pode atuar apenas como suporte físico para o microrganismo ou ainda exercer a função de suporte e de substrato, fornecendo nutrientes para o microrganismo. O sólido pode ser de origem natural, como produtos e subprodutos agrícolas, ou ser constituído por um suporte inerte suplementado com nutrientes necessários ao desenvolvimento microbiano na FES (DOMINGUEZ *et al.*, 2003; PANDEY, 2003).

A Figura 2.1 ilustra o crescimento de um fungo filamentososo em meio sólido.

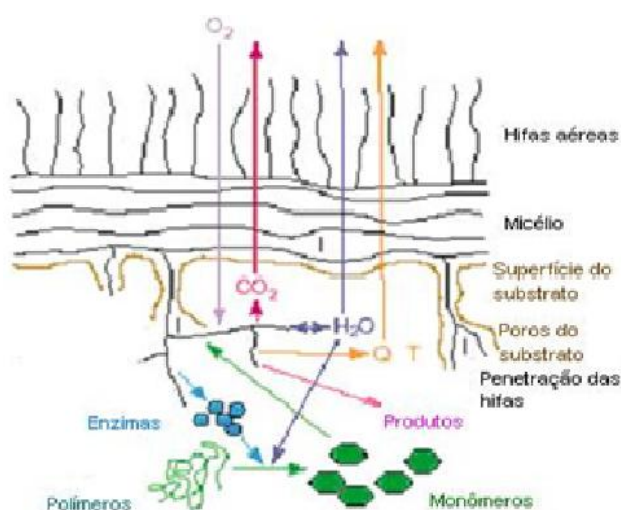


Figura 2.1: Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos (HÖLKER & LENZ, 2005).

Vários suportes são investigados na literatura envolvendo a agregação de valor a resíduos agroindustriais, uma vez que a base da economia brasileira atual está voltada para produtos agroindustriais. Entre os resíduos mais citados como suporte para a FES estão: o farelo de trigo (COURI *et al.*, 2006a; UL-HAQ *et al.*, 2002; MAHADIK *et al.*, 2002;), a torta do óleo de gergelim (KAMINI *et al.*, 1998), a torta do óleo de oliva (CASTILHO *et al.*, 2000), a torta do óleo de babaçu (CASTILHO *et al.*, 2000; CAVALCANTI *et al.*, 2005), o bagaço da cana-de-açúcar, o farelo de arroz, e a torta do óleo de coco (CORDOVA *et al.*, 1998; UL-HAQ *et al.*, 2002; CAVALCANTI *et al.*, 2005).

A fermentação em estado sólido apresenta algumas vantagens e desvantagens quando comparada a fermentação submersa. A Tabela 2.3 apresenta a comparação entre os dois processos.

Tabela 2.3: Comparações entre os processos fermentativos em estado sólido e submerso

Fermentação em Estado Sólido	Fermentação Submersa
- Alguns produtos são melhor produzidos somente em condições de baixa umidade. Não pode ser usada para crescimento de microrganismos que requerem altas concentrações de água livre.	- Muitos produtos podem ser produzidos por uma grande variedade de microrganismos. Muitos produtos têm uma melhor produção nestas condições.
- O meio é relativamente simples por ser em estado bruto. Pode conter todos os nutrientes necessários para o crescimento, ou necessitar somente de uma umidificação com solução mineral. Pré-tratamento pode ser simples, como a moagem.	- O meio freqüentemente contém ingredientes altamente processados, tornado o processo mais caro.
- A baixa disponibilidade de água é uma prevenção contra contaminantes.	- Sendo um processo com uma atividade de água alta, favorece o crescimento de microrganismos contaminantes.
- Menor volume do meio no reator com uma produtividade volumétrica maior.	- Devido ao fato do meio ser diluído, ocupa maior volume no reator, no entanto sua produtividade volumétrica é menor.
- Maiores concentrações de substratos no reator podem gerar maiores concentrações de produtos.	- Grandes concentrações de substratos podem gerar problemas reológicos.
- A aeração é facilitada por existir uma grande superfície de troca entre ar e substrato.	- Existe a necessidade de uma grande quantidade de ar injetado no sistema, já que a solubilidade do oxigênio é limitada.
- Os esporos dos microrganismos podem ser utilizados diretamente na inoculação.	- Necessita de pré-cultivo, envolvendo grandes volumes de meio e tanques para o desenvolvimento microbiano.

Fonte: SATO & SUDO, 1999; PANDEY, 2003; COUTO & SANROMÁN, 2006

Embora a FES apresente um aspecto vantajoso em relação a maiores produtividades, menores custos de capital de operação, equipamentos e meios mais simples

quando comparada à fermentação submersa, algumas dificuldades são apresentadas por este processo, tais como: é um processo praticamente restrito a microrganismos capazes de crescer em ambientes com baixa concentração de água, embora já existam relatos sobre a aplicação de bactérias nos processos de FES; dificuldades no scale-up e no controle de parâmetros relacionados à transferência de massa e remoção de calor (PANDEY, 2003; SATO & SUDO, 1999; GERMANO, 2000).

Devido a essas dificuldades apresentadas, alguns autores tentam solucionar ou minimizar tais problemas, desenvolvendo biorreatores mais adequados para o processo.

Os biorreatores mais comumente utilizados em FES são do tipo bandeja, tambor rotativo, reatores de leito fixo, ou em colunas, e de leito fluidizado (SCHIMIDELL *et al*, 2001; BIANCHI, 2001, ROBINSON & NIGAM, 2003).

Na aplicação de biorreatores em escala industrial e piloto, os maiores problemas identificados estão relacionados à transferência de calor, causada pela compactação do meio, criação de caminhos preferenciais, levando a uma deficiência na aeração do meio e podendo comprometer a produtividade e o rendimento do processo. Algumas medidas para minimizar esses problemas podem ser tomadas como a circulação de ar ao redor do substrato ou entre suas partículas, e ainda a utilização de agitação do reator. No entanto, a agitação deve ser cautelosa, uma vez que fungos que não apresentam septo nas hifas podem ser pouco resistentes à agitação mecânica (DURAND, 2003).

Os reatores mais simples são os reatores de bandeja e os de coluna. Em escala de laboratório, experimentos são realizados comumente em placas de Petri, erlenmeyers, béqueres, e outros recipientes que apresentem uma boa superfície de contato entre o ar e o meio. Porém, nesses casos, somente a temperatura ambiente onde o meio inoculado foi incubado é controlada. Estes experimentos são apropriados para avaliações iniciais sobre os tipos de microrganismos que serão empregados, assim como as condições do meio de fermentação (DURAND, 2003).

Nos reatores de leito fixo, o meio inoculado é acondicionado em colunas que são incubadas em um banho termostático (Figura 2.2). Mangueiras ligadas a uma bomba de ar são acopladas na parte inferior das colunas para a realização da aeração e também para um controle da temperatura, uma vez que nesse processo fermentativo ocorre a produção de calor. Esse tipo de reator tem como vantagem o espaço reduzido, o fato de que a carga e a descarga do meio no reator é realizada de forma mais rápida e uma relação de volume total

por volume útil próximo a 1 (DURAND, 2003; SCHIMIDELL et al, 2001). Este equipamento também tem como vantagens o baixo custo e o uso relativamente fácil.

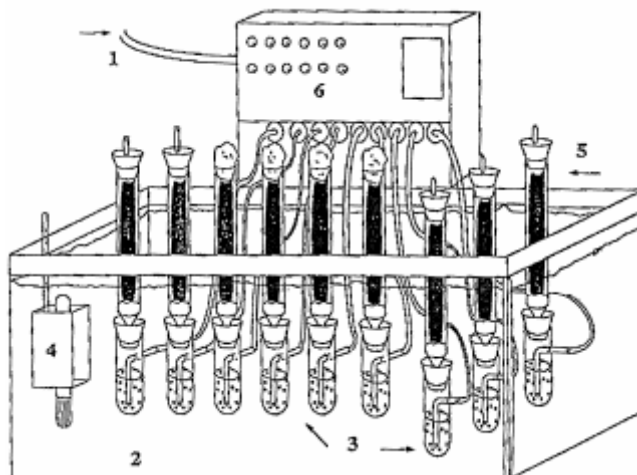


Figura 2.2: Reator de colunas de vidro para a fermentação em estado sólido

Nos reatores de tambor rotativo, a agitação promove aeração e homogeneização do meio, distribuindo mais uniformemente os nutrientes. Durante a fermentação neste reator, é possível que ocorra a pulverização de água na superfície do leito, removendo dessa forma o ar seco e o calor gerado durante a fermentação. No entanto, essa pulverização pode promover a aglomeração do meio de fermentação (SATO & SUDO, 1999; ROBINSON & NIGAM, 2003).

O interesse pela aplicação da FES tem aumentado devido à quantidade de enzimas extracelulares produzidas, além de outros metabólitos (SATO & SUDO, 1999). A FES tem sido aplicada no desenvolvimento de bioprocessos, envolvendo ainda a biodegradação de compostos e desintoxicação biológica de resíduos agroindustriais (ADAMMS *et al.*, 2002). Este processo apresenta, também, um grande potencial tecnológico no que diz respeito ao desenvolvimento de produtos que apresentam componentes derivados de microrganismos como rações para animais, produtos para a indústria alimentícia, química e farmacêutica. Estas aplicações envolvem a biotransformação de produtos e resíduos agrícolas para o enriquecimento nutricional, produção de biomassa, e formação de produtos de alto valor agregado, como antibióticos, ácidos orgânicos, biopesticidas, compostos aromáticos, enzimas e biocombustíveis (PANDEY, 2003; DE CASTRO, 2004).

De acordo com Couto e Sanromán (2006), a comparação dos processos de fermentação submersa e em estado sólido para a produção de lipases, investigada por vários autores, mostrou que a FES apresenta maiores rendimentos e estabilidade em relação à submersa.

Vários fatores podem afetar a produção de lipases extracelulares na FES, tais como pH, temperatura, aeração e composição do meio. Além disso, a presença de triglicerídios ou ácidos graxos tem sido reportada por aumentar a secreção de enzimas lipolíticas por determinados microrganismos (COUTO & SANROMÁN, 2006).

As lipases produzidas por microrganismos podem ser induzíveis ou constitutivas. As lipases constitutivas são aquelas que são produzidas independente do meio de cultura onde o microrganismo se encontra, já as lipases induzíveis têm a sua produção estimulada pela presença de algum indutor presente no meio de cultivo (FONTOURA, 2006).

A presença de substratos lipídicos e seus metabólitos, como ácidos graxos, pode estimular a produção de lipases (FONTOURA, 2006). O uso de óleos vegetais como fontes de carbono suplementares tem sido empregado para aumentar o rendimento na produção de lipase por fermentação em estado sólido, devido a sua potencial habilidade de indução (DALMAU *et al.*, 2000; COUTO & SANROMÁN, 2006; LI *et al.*, 2006).

Dalmau e colaboradores (2000) observaram que os mecanismos reguladores da biossíntese de lipase variam amplamente entre diferentes microrganismos. Resultados obtidos por estes autores, usando o gênero *Aspergillus* como agente da fermentação na produção de lipase, mostraram que a produção dessa enzima parece ser constitutiva e independente da adição de substratos lipídicos no meio de cultura, embora sua presença aumente a atividade da lipase produzida.

Diferentes parâmetros de processo foram avaliados em trabalhos anteriores pelo grupo de pesquisa da Embrapa Agroindústria de Alimentos para aumentar a produção de lipase de *Aspergillus niger* 11T53A14 por fermentação em estado sólido, tais como a seleção de microrganismo, da temperatura, da concentração de inóculo, e da fonte de nitrogênio (DAMASO *et al.*, 2005; MENEZES *et al.*, 2005).

Na FES o tipo de substrato usado pode aumentar a produção de enzimas, o que pode ser obtido pela utilização de vários rejeitos agroindustriais e alimentícios, que são ricos em ácidos graxos, triglicerídios e/ou açúcares.

Dominguez e colaboradores (2003) observaram um grande potencial na utilização de rejeitos agroindustriais (farelo de cevada) como suporte para o substrato para a

produção de lipase por FES da levedura *Y. lipolytica*, visto que tais rejeitos permitiram a obtenção de maiores atividades de lipase do que os suportes inertes.

2.10 – Monitoramento do crescimento da biomassa em fermentação em estado sólido

Vários parâmetros são importantes para melhorar a operação de um processo fermentativo, entre eles o estudo de métodos de estimativa de crescimento da biomassa, relacionando a cinética de crescimento, a morfologia do microrganismo e a produtividade. Entretanto, na fermentação em meio sólido esta estimativa torna-se mais complexa, pela dificuldade em separar o meio de cultura da biomassa, e ainda, pela precisão, sensibilidade e velocidade de estimação do método (NEVES *et al.*, 2003). Em função do que foi descrito, a literatura reporta alguns métodos de medida indireta da biomassa, tais como o método baseado na determinação de um açúcar presente na parede celular dos fungos, a glicosamina (DESGRANGES *et al.* 1991, *apud* NEVES *et al.*, 2003), que é, atualmente, o mais empregado para essa finalidade.

2.10.1 – Método químico: quantificação da glicosamina.

A glicosamina (n-acetil-D-glicosamina), representada na Figura 2.3, é um monômero da quitina, um componente estrutural e estável presente na parede celular dos fungos. A quantidade de glicosamina é um parâmetro útil para se estimar a soma total do crescimento do micélio. A quitina não é encontrada no reino vegetal, porém é encontrada também no exoesqueleto de artrópodes, em moluscos e algas marinhas.

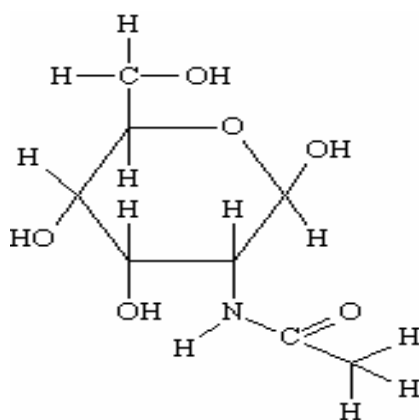


Figura 2.3: Representação esquemática da estrutura química da molécula de N-acetil-glicosamina.

Para analisar a quantidade de glicosamina é necessário que a quitina seja hidrolisada, para que seja realizada sua despolarimerização. Essa hidrólise pode ser feita por um processo alcalino ou por um processo ácido (PENMAN *et al.*, 2003; SAKURAY *et al.*, 1977).

A análise da glicosamina pode ser feita por análise colorimétrica ou por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo que a análise por HPLC diminui os problemas relacionados à falta de especificidade do método, por ser uma análise mais acurada e de maior precisão. A análise colorimétrica da glicosamina é mais imprecisa, pois quando a quitina é hidrolisada, ocorre também a hidrólise do substrato, uma vez que o micélio não pode ser separado do meio de cultura. Essa hidrólise pode gerar estruturas químicas que são semelhantes à glicosamina (outros açúcares de seis carbonos), e, desta forma, interferir no resultado da análise pela falta de especificidade (PENMAN *et al.*, 2003). Além disso, segundo Sakuray e colaboradores (1977), a quantidade de glicosamina pode mudar de acordo com as condições de crescimento do fungo e a idade da cultura, não sendo os valores encontrados adequados para estabelecer uma relação quantitativa geral da massa micelial.

2.10.2 – *Processamento digital de imagens*

Algumas metodologias têm sido reportadas como alternativas à dosagem de glicosamina para quantificação indireta da biomassa, tais como: a produção de metabólitos primários (RAIMBAULT, 1998; NEVES, 2003), a liberação de dióxido de carbono (CARRIZALEZ *et al.*, 1981 *apud* NEVES *et al.*, 2006), a variação entre a condutividade elétrica entre o substrato sólido e a biomassa (PEÑALOZA *et al.*, 1991), e mudanças de coloração do meio, determinada pela luz refletida (Murthy *et al.*, 1993).

O emprego de softwares também tem sido investigado como método de monitoramento da biomassa, como é o caso do processamento digital de imagens.

A possibilidade de se estabelecer correlações entre as características morfológicas do microrganismo, a concentração de biomassa e demais variáveis do processo fermentativo com a utilização de programas específicos de computador para o processamento digital de imagens adquiridas em fermentação submersa tem sido investigada como alternativa ao método químico tradicional (COURI *et al.*, 2003).

Em fermentações submersas, Cox e colaboradores (1991) desenvolveram um método automático para analisar a morfologia dos *pellets* de fungos em culturas submersas.

Um aprimoramento do método descrito por Cox e colaboradores (1991) foi realizado por Tucker e colaboradores (1992) para verificar a morfologia do micélio de fungos, tornando o método totalmente automatizado, permitindo assim uma análise mais completa e rápida.

A utilização desta ferramenta também foi reportada por Couri e colaboradores (2003) para a avaliação das diferentes morfologias do fungo filamentosso *Aspegillus niger* 3T5B8. O trabalho relata a influência significativa da morfologia do fungo na produção de metabólitos, através da correlação feita entre o resultado obtido com o processamento de imagens, a presença de micronutrientes estimuladores de crescimento e a produção de metabólitos.

Em fermentações no estado sólido, nas quais o meio de cultura é heterogêneo, é difícil visualizar a separação entre o meio de cultura e a biomassa crescida, tornando o emprego da técnica de processamento digital de imagens mais complexo (NEVES, *et al.*, 2003). Desta forma, são poucos os trabalhos encontrados na literatura que reportam a utilização dessa metodologia para o crescimento de fungos filamentosos e leveduras em meio sólido (NEVES, 2003).

Algumas vantagens podem ser destacadas no uso da quantificação da biomassa pela análise digital de imagens. Através desta técnica parâmetros morfológicos complexos podem ser descritos. Além disso, é possível distinguir linhagens por uma visão multiespectral. Adicionalmente, a técnica é importante para análise do crescimento em superfície e tem custo relativamente baixo. Entretanto, algumas desvantagens são descritas, tais como: a técnica não é penetrante no meio de cultivo, tornando-a inviável para a quantificação em volume, não quantifica compostos e possui grande dificuldade para distinguir o objeto de interesse do meio de cultivo heterogêneo (BELLON-MAUREL *et al.*, 2003). Desta forma, a sensibilidade do operador para a aquisição da imagem é um fator de extrema importância.

O processamento digital de imagens vem apresentando um crescente interesse por permitir o aprimoramento de informações pictóricas para a interpretação humana e a análise automática no computador de informações extraídas de uma cena (MARQUES FILHO & VIEIRA NETO, 1999; GONZALEZ & WOODS, 1993). Este tipo de análise deixou de ter

sua aplicação restrita ao uso militar e passou a ser utilizada pelas mais diversas áreas da ciência, visando a resolução de problemas.

Para que a confiabilidade de uma análise obtida por processamento digital de imagem seja alcançada, cada etapa do procedimento, desde a amostragem até a medida final, deve ser realizada de modo cuidadoso, principalmente com respeito a padrões conhecidos. A demanda por metodologias-padrão de análise, que possam ser repetidas e comparadas entre os diversos usuários de uma mesma área de pesquisa torna-se, atualmente, uma necessidade para a implantação industrial mais eficiente deste procedimento de análise.

Na área de biociências, o processamento digital de imagens pode representar uma boa alternativa para estimar o crescimento microbiano em fermentações em estado sólido, permitindo uma melhor avaliação da morfologia e da cinética de crescimento do microrganismo (COURI *et al.*, 2006b). As aplicações do processamento digital de imagens nos setores dessa área são: quantificação do crescimento e viabilidade celular; determinação de biomassa; sensibilidade celular e “*screening*” de antibióticos; adesão, morfologia e mobilidade microbiana, e modelagem do metabolismo e morfologia em microrganismos miceliais.

É possível caracterizar a biomassa da fermentação em estado sólido, obtendo-se uma relação entre a morfologia e o processo fermentativo, bem como estimar indiretamente o teor de biomassa no meio com esse método. A contagem de colônias em placas de ágar usando a análise digital de imagens é feita de forma mais rápida e correta do que a maioria dos processos manuais. O emprego da técnica, em meios sólidos transparentes como o ágar, é relativamente mais fácil que em meios mais complexos, onde não é tão evidente a separação entre o micélio do fungo e o meio de cultura (NEVES *et al.*, 2003). Em meios de cultivos onde existe um contraste eficiente entre o microrganismo crescido e o meio, também é possível quantificar taxas de crescimento, sendo o total crescido subtraído do que foi mensurado anteriormente, obtendo-se um valor de área somente devido ao crescimento do microrganismo.

As etapas formadoras do processamento de imagem são descritas por Marques Filho e Vieira Neto (1999).

- Aquisição – esta etapa tem como função converter uma imagem em uma representação numérica adequada para o processamento digital subsequente. É considerada

a etapa mais crítica do processamento, juntamente com a amostragem representativa do material a ser analisado. Dois elementos são necessários para esta etapa: o primeiro é um dispositivo físico sensível a uma faixa de energia no espectro eletromagnético, o qual produz na saída um sinal elétrico proporcional ao nível de energia detectado. Já o segundo é o digitalizador propriamente dito, o qual converte a saída elétrica do sensor físico em código binário.

- Armazenamento – uma imagem digitalizada pode ser considerada uma matriz cujos índices de linhas e colunas identificam um ponto da imagem e o correspondente valor do elemento matricial identifica os níveis de cinza naquele ponto. Os elementos de tal rede digital são chamados *pixels*. Por exemplo, uma imagem de 8 *bits* de tamanho 1024 X 1024 *pixels* requer um milhão de *bytes* para ser armazenada. Portanto, obter um armazenamento adequado é geralmente um desafio no projeto de um sistema de processamento de imagens.

- Processamento – esta etapa envolve procedimentos normalmente expressos sob forma algorítmica, onde para análise de imagens, são realizadas transformações sobre três tipos de imagens (WATKINS, 1993 *apud* NEVES, 2003):

- Imagem de vídeo, que pode ser grosseiramente definida como um conjunto de sinais eletrônicos referentes a uma função bi-dimensional da intensidade luminosa, $f(x, y)$, onde x e y representam as coordenadas no plano. O valor de f em qualquer ponto (x, y) é proporcional ao brilho (ou aos níveis de cinza) da imagem nesse ponto.

- Imagem digitalizada, que já foi definida anteriormente, como um conjunto de *pixels*, cujos valores podem variar de 1 a 255.

- Imagem binária, onde se tem uma discriminação da imagem digitalizada, reduzindo os valores dos *pixels* para 0 e 1 (ou preto e branco). Isto é realizado a partir dos algoritmos de segmentação apropriados.

- Transmissão – é possível a transferência de imagens à distância utilizando redes de computadores e protocolos de comunicação. No entanto, o grande problema é a quantidade de bytes que se necessita transmitir, principalmente quando se deseja transmitir uma seqüência de imagens.

- Exibição – monitores de TV e de microcomputadores, monocromáticos e coloridos são os principais equipamentos usados para a apresentação das imagens originais e/ou processadas nos sistemas de processamento de imagens.

4 – Materiais e métodos

4.1 – Microrganismo

O agente da fermentação utilizado neste trabalho foi uma linhagem mutante de fungo filamentosso *Aspergillus niger* 11T53A14. Essa linhagem foi obtida por mutação e seleção em trabalhos anteriores de melhoramento genético a partir de uma linhagem selvagem isolada da pimenta-do-reino desenvolvidos na Embrapa – Agroindústria de Alimentos (COURI & DE FARIAS, 1995). Por tratar-se de microrganismo geneticamente modificado, foram tomados os devidos cuidados para a manipulação e descarte. Os conídios do microrganismo foram estocados em solo estéril (-18°C), sendo posteriormente reativados em gelose inclinada de meio básico, e propagados para um meio de sabugo de milho (COURI, 1993), conforme apresentado seqüencialmente.

4.2 – Meios de cultura

4.2.1 – Meio básico

Para a melhor adaptação do microrganismo, foi utilizado um meio básico desenvolvido no laboratório de fermentações da Embrapa – Agroindústria de Alimentos, denominado SOCAREAN e apresentado na Tabela 4.1. Este meio é constituído por sais minerais e agar, tendo como fonte de carbono para a produção de lipase, o óleo de oliva.

Tabela 4.1: Composição do meio básico SOCAREAN

Reagentes	Concentração (g/L)
Fonte de carbono (óleo de oliva)	20,00
NaNO ₃	3,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
KCl	0,50
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
KH ₂ PO ₄	1,00
Agar-agar	30,00

O pH deste meio foi ajustado para a faixa de 5,5 com soluções de NaOH 1 mol/L ou HCl 0,1 mol/L, antes da adição do agar. O volume foi ajustado para 1L e o meio foi cuidadosamente vertido em tubos de ensaios, os quais foram tampados com rolhas de algodão cardado e autoclavados a 1 atmosfera em 120°C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos foram acondicionados de modo a formar uma superfície inclinada. Em seguida, os conídios do microrganismo foram transferidos do solo para a gelose inclinada, sendo finalmente reativados. Um segundo repique, no mesmo meio, a partir do primeiro foi realizado após sete dias, para a total reativação do microrganismo. Os cultivos foram incubados em estufa incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) durante sete dias a 32°C para perfeito crescimento do fungo. Os conídios da segunda ativação foram empregados na inoculação do meio de sabugo de milho (MSM).

4.2.2 – Meio de sabugo de milho (MSM)

Esta etapa teve como objetivo o desenvolvimento de conídios do fungo *Aspergillus niger* 11T53A14, em um meio sólido, que foram utilizados na inoculação do processo fermentativo.

Para a produção deste meio foi utilizado sabugo de milho, previamente seco e triturado, e uma solução de peptona de soja enriquecida com sais minerais (Tabela 4.2). Após a homogeneização em um erlenmeyer de 25 mL, o meio foi autoclavado por uma hora a uma atmosfera a 120° C.

Tabela 4.2: Composição do meio de sabugo de milho

Componentes do meio	Quantidades
Sabugo de milho	4,6 g
Peptona de soja	2,8 g
KH ₂ PO ₄ , 20% m/v	0,19 mL
ZnSO ₄ . 7H ₂ O, 3,96% m/v, FeSO ₄ . 7H ₂ O, 4,6% m/v e	
MnSO ₄ . 7H ₂ O, 0,01% m/v	0,025 mL
HCl 2mol/L	1 gota

O MSM foi inoculado com 1,0 mL da suspensão dos conídios reativados no meio básico. Fez-se a suspensão dos conídios utilizando uma solução de Tween 80 – 3% (v/v), para o máximo desprendimento dos mesmos da gelose inclinada.

Após a inoculação, o meio foi homogeneizado e colocado em estufa BOD a 32°C por 5 dias. Durante o período de incubação, foram observados aspectos do desenvolvimento do fungo, tais como: coloração, formação de micélio aéreo, esporulação e presença de contaminantes. Após

esse período, os frascos foram guardados sob refrigeração a 4°C até sua utilização. Mediante qualquer alteração observada, o frasco era esterilizado e descartado.

4.3 – Preparo e quantificação do inóculo

Em cada frasco com meio de sabugo de milho, foram adicionados 20 mL de uma solução estéril de Tween 80 3% (v/v). Com a ajuda de um bastão de vidro foi realizada a agitação manual dos frascos a fim de promover a liberação dos conídios. Em seguida, esta suspensão foi filtrada em gaze esterilizada e transferida para um recipiente estéril.

A concentração dos conídios na solução foi determinada em câmara de Neubauer. O volume de inóculo para a fermentação foi calculado objetivando a concentração final de 10^7 conídios/g de meio, a qual foi considerada ideal para o crescimento do *Aspergillus niger* 3T5B8 em meio de farelo de trigo, de acordo com trabalhos anteriores (COURI *et al*, 1995, NEVES, 2003).

4.4 – Processo de fermentação em estado sólido (FES)

4.4.1 – Seleção da fonte de carbono

Inicialmente, foram realizados testes para verificar a melhor fonte suplementar de carbono para a produção de lipase. O experimento ocorreu em frascos erlenmeyer com volume de 250 mL, contendo 40g de meio. O meio de fermentação foi constituído por 100 g de farelo de trigo e 2% (m/m) de uma das seguintes fontes suplementares de carbono: óleo de mamona, óleo de milho, óleo de soja, óleo de palma, e borra do refino do óleo de milho. Os meios foram ainda enriquecidos com uma fonte de nitrogênio através da adição de uma solução de sulfato de amônio 0,91% (m/v), e a umidade do meio foi ajustada para 60% com essa mesma solução. A Tabela 4.3 apresenta a constituição do meio de fermentação empregado neste experimento.

Tabela 4.3: Composição do meio de fermentação

Componentes	Quantidades
Farelo de trigo	100 g
Solução de sulfato de amônio 0,91%	60 mL
Fonte de carbono	2% m/m

Após a homogeneização dos meios de fermentação, estes foram autoclavados a 120°C/ 1 atm por 15 minutos. Em seguida, o meio foi inoculado com uma concentração de 10^7 conídios/g substrato. Todos os frascos inoculados foram incubados em BOD a 32°C, por 72 horas. Foram retiradas amostras para determinação da atividade da lipase produzida, conforme será apresentado no item 4.6.

4.4.2 – Influência da concentração de óleo de mamona e do teor de umidade na produção de lipase

Os experimentos para avaliação das melhores condições para a produção de lipase, variando a concentração de óleo de mamona e o teor de umidade do meio foram realizados em um reator de FES em colunas. Assim, os meios de fermentação foram preparados de modo similar àquele apresentado no item 4.2.2, porém, neste caso, duas concentrações de óleo de mamona (0, 2 e 4%) e três condições de umidade (50, 60 e 70%, ajustadas através da adição da solução de sulfato de amônio 0,91% m/v) foram estudadas. Os meios homogeneizados foram, então, esterilizados a 120°C em 1atm por 15 minutos e inoculados para uma concentração de 10^7

conídios de *Aspergillus niger* 11T53A14 (crescidos em meio de sabugo de milho, conforme descrito no item 4.3) por g de substrato.

Aproximadamente 16 g do meio inoculado foram colocados em reatores de colunas de vidro (210 mm de altura x 22 mm de diâmetro), previamente esterilizados, com aeração e banho termostático com circulação Marconi (Figura 4.1). O experimento foi realizado por um período de 72 horas a 32 °C com uma taxa de aeração de 4 L/h, e foi monitorado a cada 24 h para a determinação da atividade da lipase.



Figura 4.1: Reator de colunas de vidro com banho termostático

4.4.3 – Monitoramento do crescimento da biomassa

O monitoramento do crescimento da linhagem *Aspergillus niger* 11T53A14, por processamento digital de imagens, foi realizado em cinco replicatas, num tempo total de 96 horas. Em experimentos anteriores, realizados no laboratório de tecnologia de fermentações da Embrapa Agroindústria de Alimentos (PINTO, 1998 e GOMES, 1995), foram utilizadas bandejas de 3,5 cm de altura com ocupação de 1,5 cm com o meio de fermentação. Porém, para maior facilidade

de manuseio seguiu-se o procedimento realizado por Neves (2003), com a substituição das bandejas por placas de Petri com dimensões de 1,5 cm de altura por 9 cm de diâmetro. Cada placa foi cuidadosamente preenchida com 16 g do meio de fermentação, contendo farelo de trigo com 60% de umidade e com 2% m/m de óleo de mamona. Trinta placas foram, assim, preparadas, sendo todas esterilizadas sob as mesmas condições descritas anteriormente. Vinte e cinco destas placas foram inoculadas com uma concentração de 10^7 conídios/g de substrato, enquanto que cinco foram reservadas para uso como teste em branco do processo de fermentação.

Todas as placas foram incubadas em BOD a 32 °C por 96 horas. A cada 24 horas, todas as placas eram retiradas para a aquisição das imagens e, simultaneamente, cinco destas eram removidas para a realização das análises de glicosamina e da atividade enzimática da lipase.

4.4.3.1 – Aquisição e processamento de imagens

Para os procedimentos de amostragem e processamento de imagens, foi considerado que os fungos cresciam como um sistema de tubos ou fibras interconectados, cercados pelo meio de fermentação. Como as seções utilizadas para a aquisição de imagens eram muito espessas, em comparação com o diâmetro tubular das hifas, qualquer variação observada na amostragem em decorrência de efeitos de borda pode ser considerada desprezível (GUNDERSEN *et al.*, 2002). Uma imagem foi adquirida de cada uma das placas de Petri, em cada 24h de fermentação, durante todo o período em que o experimento foi realizado.

O primeiro grupo de imagens obtido no tempo de fermentação igual a zero (T_0) foi obtido pelo emprego de amostragem randômica simples (HOWARD & REED, 1998; GUNDERSEN *et al.*, 1999). Após este tempo de fermentação, todas as amostras foram aquisitadas sempre no mesmo ponto, a fim de permitir a subtração posterior dos resultados obtidos em T_0 .

A aquisição das imagens foi realizada com auxílio de um microscópio estereoscópico Carl Zeiss STEMI 2000-CS e com uma câmera digital Sony Cyber Shot DSC-S75, acoplada ao microscópio.

Couri e colaboradores (2006b) e Neves (2003) relataram condições preliminares para a aquisição das imagens, onde os melhores resultados descritos foram obtidos com condições de iluminação fluorescente externa, magnificação do microscópio aumentada em 10x e uma resolução digital de 640 x 480 “pixels”. Após a aquisição, as imagens foram submetidas ao processamento digital usando o software KS400 versão 2.0 (Kontron Eletronic GMB).

Objetivando a quantificação das hifas crescidas no meio de fermentação em estado sólido, optou-se por um processamento de imagens que pudesse destacar ao máximo as hifas do meio de cultivo, antes da realização das medidas.

Com esta finalidade, uma sub-rotina foi criada e é apresentada no esquema da Figura 4.2. O primeiro passo foi realçar os contornos da imagem a ser analisada, uma vez que as hifas aderem à superfície do farelo de trigo. Em seguida, foi feita uma limiarização, permitindo uma separação da imagem em fundo e objeto (a região destacada na etapa anterior). Ao fundo foi designado o valor de 0 (preto), e ao objeto o valor 1 (branco). Por isso, esse processo também pode ser chamado de binarização (MARQUES FILHO & VIEIRA NETO, 1999). Esta etapa depende da sensibilidade do operador para que não sejam quantificadas áreas diferentes das hifas que indicam o crescimento do fungo. Após a limiarização, uma etapa de afinamento foi realizada a fim de separar os “pixels” que realmente constituem o objeto de interesse. Depois de finalizado o processamento das imagens, a área total coberta pelas hifas pode ser mensurada. Esta sub-rotina foi usada para analisar todas as imagens, em todos os tempos de fermentação a partir de 24h de fermentação (T_{24}).

Pode-se observar, nas Figuras 4.3 a 4.6, um exemplo do processamento de uma imagem original com o uso da sub-rotina mencionada.

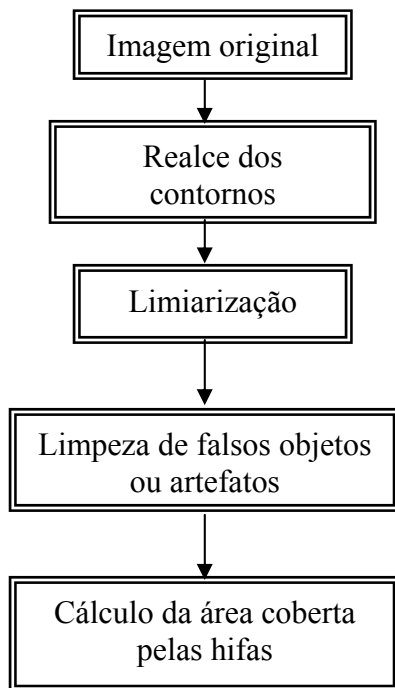


Figura 4.2: Fluxograma da sub-rotina adotada para o procedimento de análise de imagens.

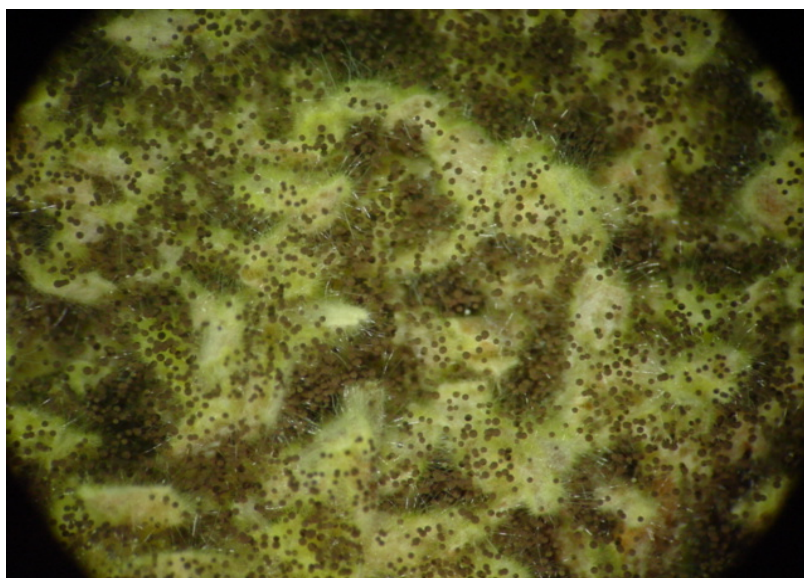


Figura 4.3: Crescimento do fungo *Aspergillus niger* 11T53A14 em 24 horas (imagem original)

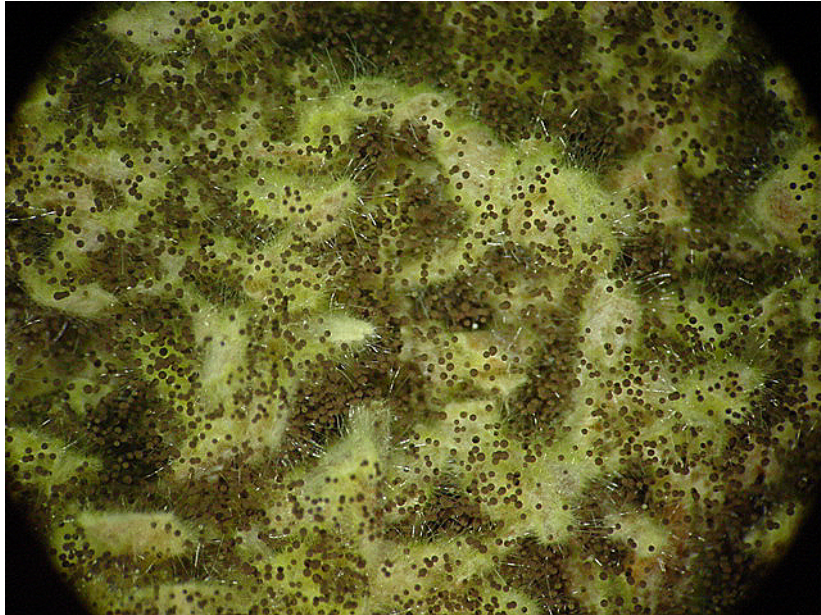


Figura 4.4: Realce dos contornos da imagem original com o uso de um filtro passa-alta

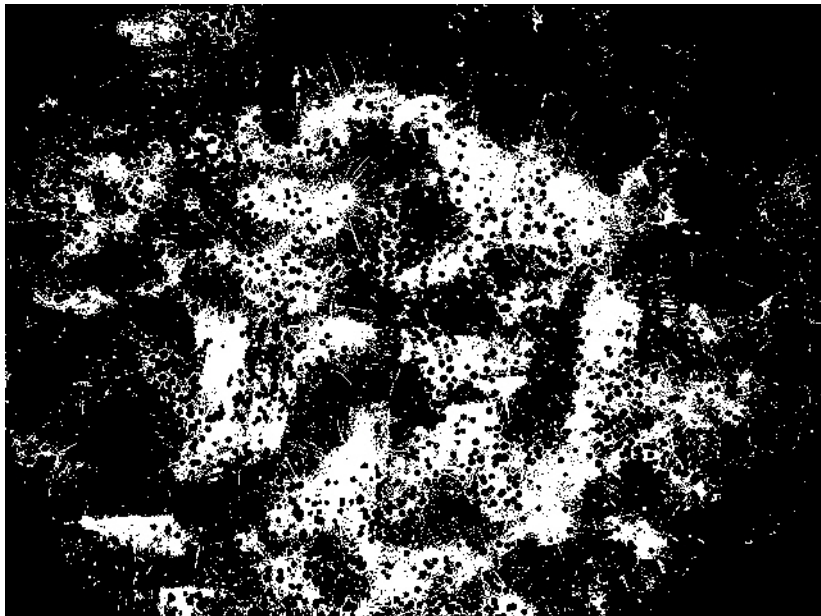


Figura 4.5: Binarização da imagem, visando a separação entre as hifas do fungo e o farelo de trigo, através de um filtro limitador fixo

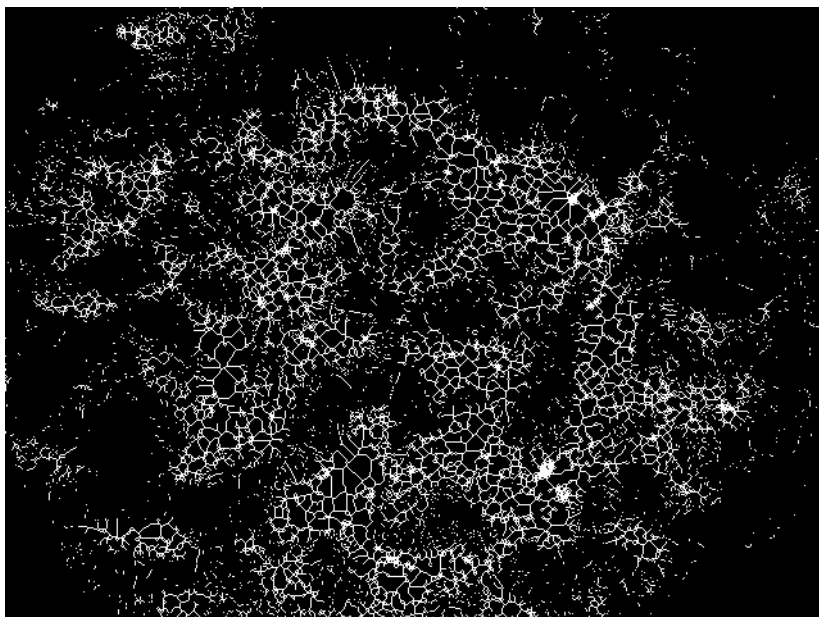


Figura 4.6: Segmentação das hifas a serem quantificadas no processamento, através de um método de afinamento

Uma sub-rotina foi criada separadamente para a aplicação nas imagens adquiridas em T_0 , pois Couri e colaboradores (2006b) mostraram que a morfologia irregular do farelo de trigo poderia gerar um contraste suficientemente elevado para ser verificado pelo software na etapa de binarização. Neste trabalho, a sub-rotina em T_0 foi apropriada para esta etapa, de modo a permitir que os resultados obtidos nos tempos T_{24} a T_{96} , pudessem ser subtraídos daqueles obtidos em T_0 , indicando o crescimento do microrganismo com o tempo, sem o efeito do farelo.

4.4.3.2 – Determinação do teor de glicosamina

O teor de glicosamina foi estimado, segundo Blix (1948) e Sakuray e colaboradores (1977), utilizando 0,5g de meio fermentado, previamente seco por 24 h a uma temperatura de 80°C. Foram adicionados a este meio 2mL de uma solução de ácido sulfúrico 70% v/v para total digestão dos componentes das hifas do fungo. Após 24 horas de digestão, 5,0 mL de água

destilada foram adicionados a cada tubo de ensaio com tampa rosqueada e autoclavados por 1 hora a 120°C/ 1 atm. O produto foi filtrado quantitativamente e neutralizado com uma solução de NaOH 5M.

Uma alíquota de 1mL da solução neutralizada foi retirada e colocada em tubos de ensaio contendo uma solução de acetilacetona. Este tubo foi, posteriormente, aquecido a 96°C por 20 minutos. Depois do resfriamento da amostra, foram adicionados 10mL de etanol P.A. e 1,0mL de uma solução de ρ -dimetilaminobenzaldeído. Após 45 minutos de reação, foram realizadas as leituras das absorvâncias das amostras, em espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 10, em um comprimento de onda de 530 nm.

A curva padrão para a determinação do teor de glicosamina nas amostras foi montada a partir de uma solução de 100 mg/L de glicosamina os padrões foram diluídos nas proporções de 1/10, 1/30, 1/50, 1/70 e 1/100mL, e submetidos ao mesmo processo de reação das amostras.

Para evitar quaisquer erros na determinação de glicosamina devido a possíveis falsos resultados provenientes da hidrólise ácida utilizada, o teor de glicosamina no meio de cultivo não inoculado foi medido e o valor encontrado foi descontado daqueles encontrados nas amostras avaliadas (ensaio em branco).

4.4.4 – Determinação da atividade da lipase

Após o término de cada fermentação, adicionou-se ao meio fermentado uma solução de tampão fosfato de sódio 100 mmol/L (pH 7,0) para extração da lipase do meio de fermentação. O volume do tampão (mL) foi calculado em função da massa do meio fermentado (PEREIRA *et al*, 2006), de acordo com a Equação 1, apresentada a seguir:

$$\text{Volume de tampão (mL)} = \frac{\text{massa do meio fermentado (g)} \times 100}{40} \quad (1)$$

Onde a razão 100/40 representa a razão padrão entre o volume de tampão adicionado e a massa do meio fermentado.

O processo de obtenção do extrato enzimático ocorreu por 1 hora à 32° C, em banho termostático com agitação. O extrato foi filtrado a vácuo, em membranas de filtração média e lenta, e em membrana de microfiltração Millipore, sendo posteriormente armazenado em tubos de vidro com tampa rosqueada.

A dosagem da atividade da lipase foi realizada por titulometria de neutralização, e baseia-se na atuação hidrolítica da enzima sobre o óleo de oliva presente na emulsão água/óleo (1:1) com 7g de goma arábica. Tal reação ocorre em um meio reacional contendo 5mL da emulsão, 4mL de tampão acetato pH 4,0 e 1mL do extrato enzimático, promovendo a liberação de ácidos graxos, que deverão ser consumidos por um volume de hidróxido de sódio 0,05 mol/L necessário para neutralizá-lo. O tempo de reação foi de 15 minutos a 35° C, em banho termostático com agitação. A atividade enzimática (U/mL) foi calculada de acordo com a Equação 2:

$$Atividade = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 1000}{t \times V_c} \quad (2), \text{ onde:}$$

V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL);

V_b = volume de NaOH gasto na titulação do branco da amostra (mL),

V_c = volume de enzima utilizada na reação (mL),

M = concentração molar do NaOH,

t = tempo da reação (min).

1000 = taxa de diluição constante

4.4.5 – Imobilização da lipase produzida

O extrato enzimático produzido foi centrifugado e o sobrenadante foi desidratado por liofilização. O produto desidratado foi solubilizado em tampão fosfato (0,05 mol/L pH 7,0) e submetido a uma imobilização por adsorção física em suporte hidrofóbico, de acordo com a metodologia descrita por Oliveira e colaboradores (2006). O processo de imobilização da lipase foi realizado no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob a orientação da professora Denise Maria Guimarães Freire.

4.4.6 – Determinação da atividade de esterificação da lipase imobilizada

A atividade de esterificação da lipase imobilizada foi avaliada pelo consumo do ácido oléico na reação de esterificação com butanol a 45°C empregando 3% (m/m) de enzima. 30 micromoles de ácido oléico e 30 micromoles de butanol foram adicionados em um reator aberto provido de agitação magnética, de capacidade de 15mL, encamisado e acoplado a um banho termostático (HAAKE D10). A reação de esterificação foi iniciada após a adição de 0,16g da lipase imobilizada ao meio reacional. Alíquotas de 100µL, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero e durante a reação e foram diluídas em 20mL de uma solução de acetona/etanol (1:1). A quantidade de ácido oléico consumido nas amostras diluídas foi determinada por titulação contra NaOH 0,04 mol/L, utilizando titulador automático (Metler DL25).

A Equação 3 descreve o cálculo da atividade de esterificação da lipase:

$$A(U / g) = \frac{(V1 - V2) \times M}{t \times m} \times \frac{Va}{Vmr} \times 1000 \quad (3), \text{ onde:}$$

A = atividade enzimática (U/g);

V_1 = volume de NaOH consumido na titulação da amostra retirada no tempo zero de reação (mL);

V_2 = volume de NaOH consumido na titulação das amostras retiradas durante a reação (mL);

M = concentração da solução de NaOH em mol/L;

t = tempo de reação (min);

m = massa de preparação enzimática utilizada na reação (g);

V_a = volume da amostra (mL);

V_{mr} = volume do meio reacional (mL).

Uma unidade de atividade de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μ mol de ácido oléico por minuto (U.I), nas condições citadas (DIAS *et al.*, 2006).

A atividade de esterificação da lipase também foi avaliada em meio reacional contendo 50% v/v de hexano.

4.4.7 – Produção de biodiesel utilizando lipase imobilizada

As reações de transesterificação foram realizadas em reator batelada fechado, de capacidade de 15mL, provido de condensador e de agitação magnética. A água que circula no condensador foi resfriada com auxílio de um banho termostático, para evitar a perda do álcool por volatilidade. A temperatura do meio reacional foi de 40°C, mantida constante através da circulação de etileno glicol pela camisa do reator, proveniente de um banho termostático (Haake DC10).

O meio reacional foi constituído na mistura dos reagentes (etanol e óleo de soja) e 7% (m/m) da lipase imobilizada. O efeito da adição de solvente orgânico, também foi avaliado na

produção de biodiesel. Nesses experimentos, o meio reacional foi constituído pelos mesmos reagentes da condição anterior adicionando hexano 50% v/v. O progresso da reação foi acompanhado pela retirada de amostras de 50µL, em duplicata, que foram diluídas em hexano e analisadas por cromatografia gasosa.

4.4.8 – Análise cromatográfica

As amostras foram injetadas no cromatógrafo a gás Varian, modelo CP-3380, equipado com detector de ionização de chama (DIC) e uma coluna capilar CP WAX 52 CB de 30m x 0,25mm x 0,25mm, em sistema de injeção split com razão de 1:20. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 250°C. A taxa de aquecimento foi de 20°C/min. O forno foi inicialmente mantido por 4,5 minutos a 200°C e, em seguida, aquecido até 210°C, mantendo-se constante nesta temperatura por 0,5 minuto. A seguir, foi aquecido até 220°C e mantido novamente por 0,5 minuto. Novo aquecimento do forno até 250°C a uma taxa de 30°C/min até 250°C e mantido por 1,5 minutos. Hidrogênio foi o gás de arraste utilizado a uma vazão de 1,8 mL/min e a pressão da coluna foi mantida constante em 12 psi. Um computador, equipado com o software Star Workstation 6.2, foi conectado ao CG através do Star 800 Module Interface para integrar automaticamente os picos obtidos. Heptadecanoato de metila foi utilizado como padrão interno.

4.5 – Análise da atividade de água (Aw) e da umidade do meio de fermentação

Para todos os experimentos, a atividade de água e a umidade no meio de fermentação, foram analisadas. A determinação da umidade foi realizada pelo método gravimétrico, onde aproximadamente 2g de cada amostra foram cuidadosamente pesados e colocados em estufa a 80°C por 24h. As amostras foram pesadas e pela diferença entre a massa inicial e a massa final, o

peso seco foi calculado. A umidade foi calculada através da divisão entre a variação das massas pesadas e a massa inicial do meio. O percentual foi calculado pela multiplicação do resultado por 100.

A atividade de água foi determinada no equipamento Rotronic Hygropalm AW1, onde uma alíquota do meio foi colocada na placa de análise descartável do equipamento até cobrir toda a superfície desta. Após aproximadamente 5 minutos, a umidade da fase gasosa do meio entra em equilíbrio com a umidade do meio, informando, assim, a atividade de água correspondente.

4.6 – Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente com o uso do programa Statística versão 6.0. Como os dados não apresentaram uma distribuição normal, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi usado para verificar a tendência geral do crescimento, enquanto o teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi aplicado para detectar qualquer diferença entre os grupos. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Os ajustes das curvas experimentalmente obtidas foram realizados através do programa Microcal Origin versão 5.0.

5 – Resultados e Discussões

5.1 – Influência do teor de umidade na produção de lipase

Conforme mencionado na seção de Revisão Bibliográfica, parâmetros de processo relevantes a produção de lipase de *Aspergillus niger* 11T53A14, foram avaliados pelo grupo de pesquisa da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Neste trabalho, para investigar a influência da umidade na produção de lipase de *Aspergillus niger* 11T53A14 durante a fermentação em estado sólido em meio de farelo de trigo, diferentes quantidades da solução de sulfato de amônio foram adicionadas ao meio de cultura de modo que o teor de umidade atingisse os valores de 50, 60 e 70%.

Os resultados, apresentados na Figura 5.1, mostram que o melhor teor de umidade para a produção de lipase foi de 60%. Um aumento ou diminuição desse valor acarretou em um decréscimo na produção de lipase, evidenciado pelos menores valores de atividade.

O teor de umidade na fermentação em estado sólido tem um grande impacto nas propriedades físicas do substrato. Um aumento no teor de umidade causa um decréscimo na porosidade do substrato, diminuindo a troca de gás. Um baixo teor de umidade acarreta num menor crescimento do microrganismo e um menor grau de inchamento do substrato, o que também diminui a produção de enzima (MAHANTA et al., 2007)

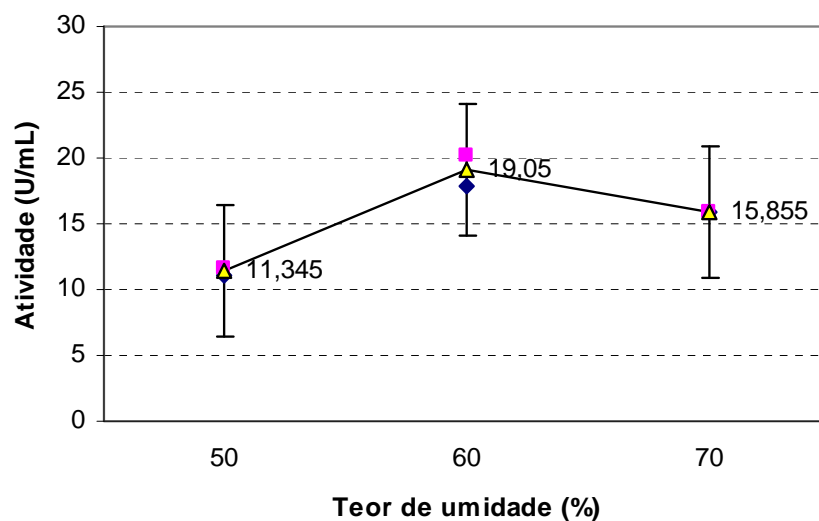


Figura 5.1: Influência do teor de umidade na produção de lipase por fermentação de *Aspergillus niger* 11T53A14 em farelo de trigo.

Para se verificar se o teor de umidade sofria alterações ao longo do processo de fermentação, a atividade de água e a umidade do meio foram monitorados durante 96 horas na fermentação do *Aspergillus niger* 11T53A14 em meio de farelo de trigo. O teor de umidade foi ajustado pela adição de sulfato de amônio até 60%. Os resultados estão apresentados na Figura 5.2 e na Figura 5.3.

De acordo com os resultados obtidos, o meio de fermentação, nas condições de trabalho adotadas, não apresentou uma variação significativa no teor de umidade ao longo do processo. A atividade de água também permaneceu praticamente constante durante todo o experimento. No entanto, observou-se que apesar da adição da solução de sulfato de amônio ter sido realizada para que o teor de umidade no meio fosse de 60%, as análises do teor de umidade revelaram em menores valores.

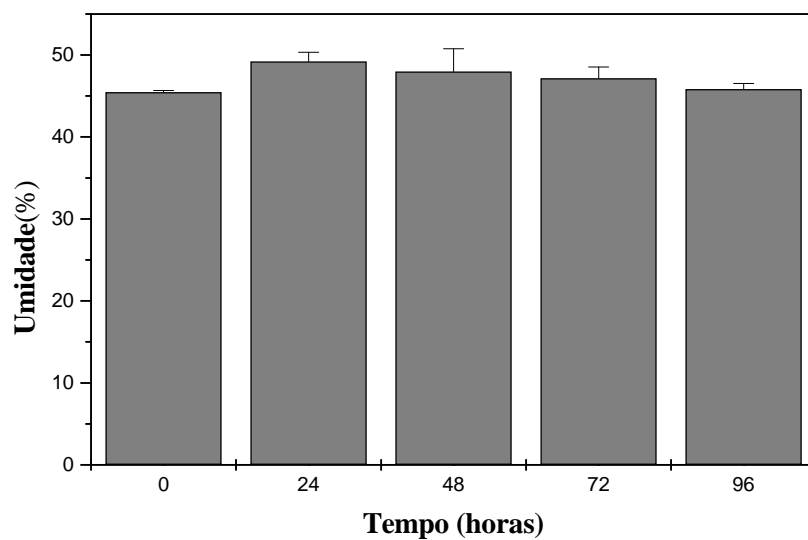


Figura 5.2: Variação do teor de umidade no meio de farelo de trigo da fermentação do *Aspergillus niger* 11T53A14 em estado sólido em placas ao longo do tempo de 96 horas

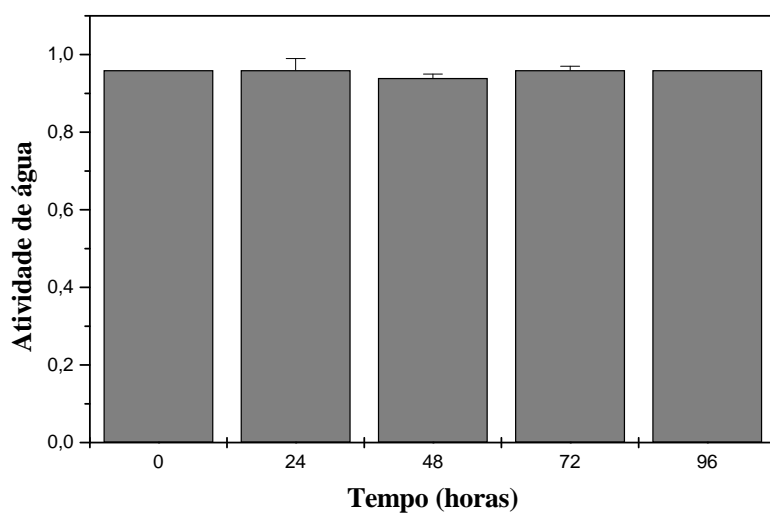


Figura 5.3: Variação da atividade de água no meio de farelo de trigo da fermentação do *Aspergillus niger* 11T53A14 em estado sólido em placas ao longo do tempo de 96 horas

5.2 – Influência da fonte de carbono suplementar na produção de lipase

Com a finalidade de estudar o efeito de diferentes fontes suplementares de carbono para elevar a produção de lipase, diferentes óleos vegetais, como mamona, soja, milho, oliva e palma, foram adicionados ao processo fermentativo na concentração de 2% (m/m). Nas condições experimentais estudadas, com o meio contendo 60% de umidade e inoculado com uma concentração de 10^7 esporos/substrato, o meio contendo óleo de mamona como fonte suplementar de carbono apresentou o melhor resultado, alcançando 23,7 U/mL de atividade enzimática, conforme ilustrado na Figura 5.4.

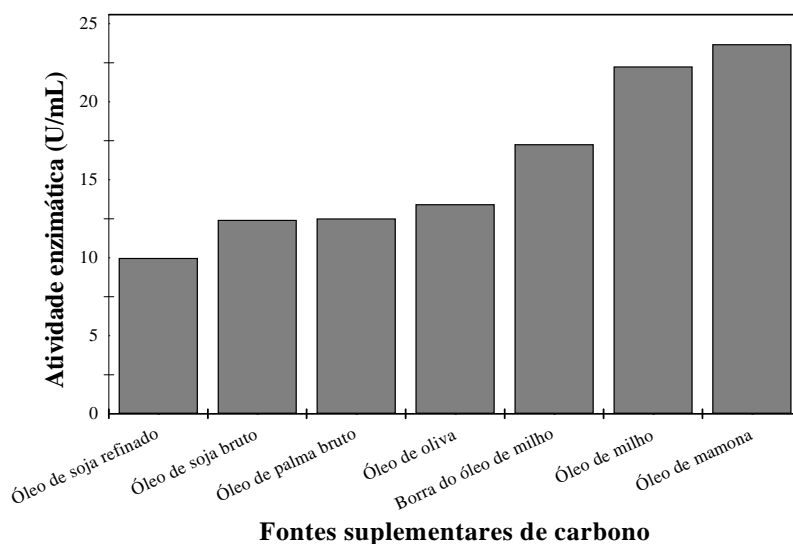


Figura 5.4: Efeito da adição de diferentes fontes suplementares de carbono na produção de lipase de *Aspergillus niger* 11T53A14 por fermentação em estado sólido

Rodriguez e colaboradores (2006) estudaram o efeito da adição de diferentes triglicerídios, como óleos de oliva, de girassol, de milho, de amendoim e de semente de uva, na produção de lipase por *Rhizopus homothallicus* em fermentação em estado sólido. Os autores observaram que este fungo produziu quantidades similares de lipases para todos

os óleos estudados. Segundo esses autores, esses resultados indicam que o óleo mais barato e/ou mais disponível pode ser empregado como fonte de carbono suplementar para a produção de lipases em escala industrial.

Com base nos resultados, optou-se por dar continuidade a esse estudo utilizando apenas o óleo de mamona como fonte de carbono suplementar. Desta forma, meios de cultura sem óleo de mamona e com duas diferentes concentrações desta fonte suplementar (2 e 4% m/m) nas condições de umidade e concentração de inóculo anteriormente selecionadas, foram submetidos os experimentos de fermentação em estado sólido para investigar qual a melhor concentração desse óleo na produção de lipase por *Aspergillus niger* 11T53A14. De acordo com os resultados apresentados na Figura 5.5, a melhor concentração de óleo de mamona no meio de fermentação foi de 2% m/m. A concentração de óleo de mamona mais elevada (4% m/m) causou uma queda significativa na atividade lipásica. Possivelmente, o aumento da quantidade de ácidos graxos livres decorrentes da hidrólise do óleo de mamona pode ter causado inibição na produção de lipase.

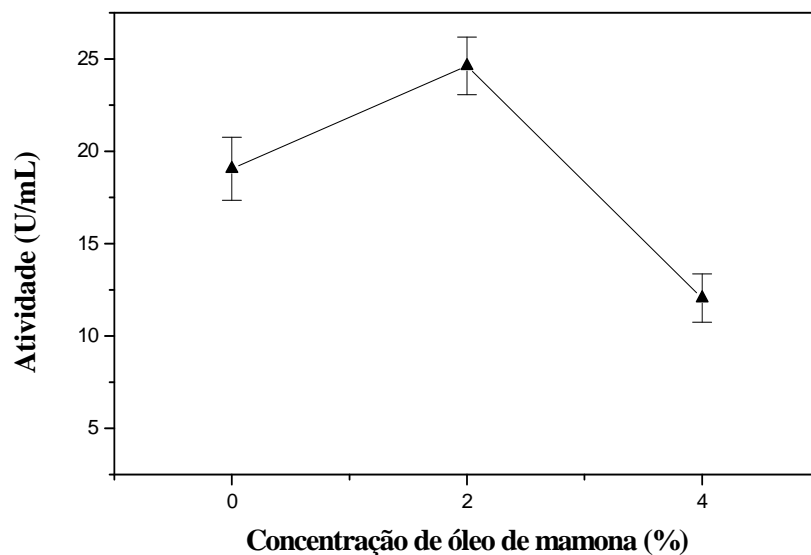


Figura 5.5: Efeito da concentração de óleo de mamona na produção de lipase de *Aspergillus niger* 11T53A14 por fermentação em estado sólido com teor de umidade de 60% por 96 horas

Gombert e colaboradores (1998) também avaliaram a produção de lipase empregando diferentes concentrações de fontes de carbono (0, 1, 2 e 4%), e a melhor condição foi observada com a adição de 2% m/m de óleo de oliva.

Li e colaboradores (2006) observaram o efeito indutor do ácido oléico na produção de lipase e também verificaram que um aumento na concentração desse ácido acima do valor ótimo encontrado (0,4% m/m) acarretou na diminuição da atividade lipásica. Os autores justificaram esse resultado pela inibição na produção da lipase em função da mudança da concentração do ácido oléico durante a fermentação.

Considerando os resultados obtidos, todos os ensaios posteriores foram realizados com meio de cultura contendo 60% de umidade e 2% m/m de óleo de mamona.

5.3 – Monitoramento do crescimento da biomassa

5.3.1 – Processamento digital de imagens

Usualmente, a determinação do crescimento da biomassa em fermentação em estado sólido é realizada por métodos indiretos, como, por exemplo, a estimação pela variação do teor de glicosamina ou a produção de um metabólito como a lipase (PENMAN *et al.*, 2000). Como alternativa aos métodos usualmente empregados, o processamento digital de imagem foi estudado neste trabalho para a determinação indireta do crescimento da biomassa através da medida da área da hifa do fungo *Aspergillus niger* 11T53A14 ao longo do processo de fermentação.

As Figuras 5.6 a 5.21 ilustram o acompanhamento do procedimento para o monitoramento do crescimento da biomassa do fungo *Aspergillus niger* 11T53A14 das amostras ao longo do processo de fermentação em estado sólido por 96 horas, utilizando o óleo de mamona (2% m/m) como fonte suplementar de carbono. São apresentadas as principais etapas do processamento digital de imagens exemplificadas na Figura 4.2 da seção de Materiais e Métodos para cada uma das 24 horas de fermentação em que as áreas das hifas foram medidas. Observa-se o substrato sem crescimento no tempo T_0 (Figura 5.6), que mesmo realçado na Figura 5.7, praticamente não produz “resíduos” mensuráveis (Figura 5.8). A partir de 24 horas de fermentação (Figura 5.9), é possível notar o crescimento da biomassa e a produção de esporos na superfície do meio de fermentação, principalmente na Figura 5.10, onde a etapa de realce foi efetuada. Verifica-se ainda, nas Figuras 5.11, 5.15 o crescimento da área a ser quantificada, após a aplicação das etapas da sub-rotina de processamento de imagens desenvolvidas, para os períodos de 24 e 48 horas de fermentação, respectivamente. Por outro lado, não se observa qualitativamente aumento nos resíduos nas etapas a partir de 48 horas de fermentação (Figuras 5.15, 5.18 e 5.21).



Figura 5.6: Imagem original adquirida no tempo zero da fermentação em estado sólido pelo microrganismo *Aspergillus niger* 11T53A14



Figura 5.7: Realce dos contornos da imagem da Figura 5.6, através de um filtro passa-alta

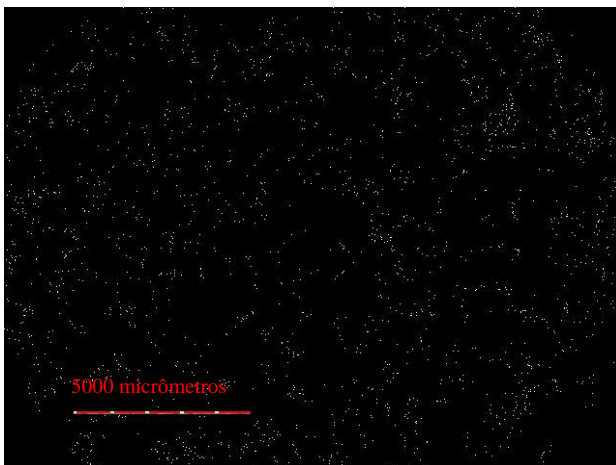


Figura 5.8: Quantificação da biomassa de *Aspergillus niger* 11T53A14 no tempo zero através de um método de afinamento

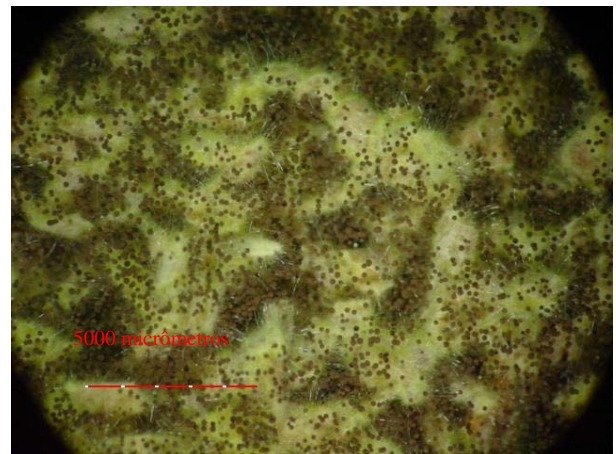


Figura 5.9: Imagem original adquirida do crescimento do fungo *Aspergillus niger* 11T53A14 em fermentação em estado sólido no tempo de 24 horas

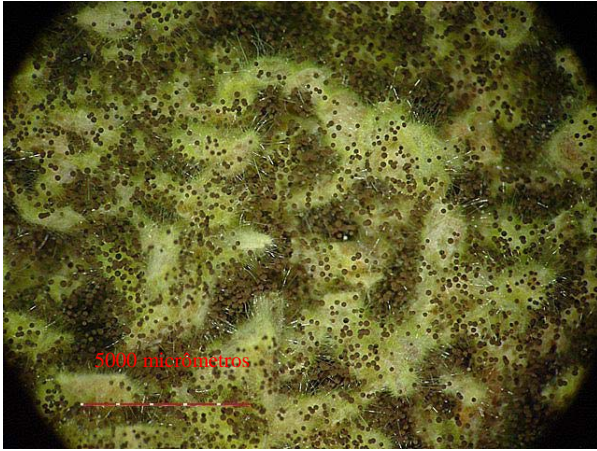


Figura 5.10: Realce dos contornos da imagem 5.9, através de um filtro passa-alta

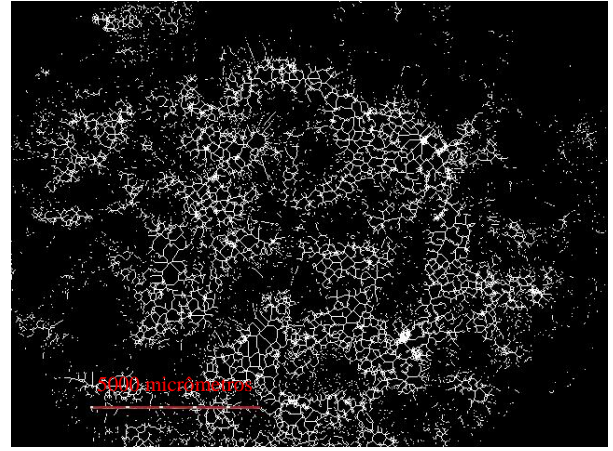


Figura 5.11: Quantificação da biomassa de *Aspergillus niger* 11T53A14 crescida em 24 horas de fermentação em estado sólido

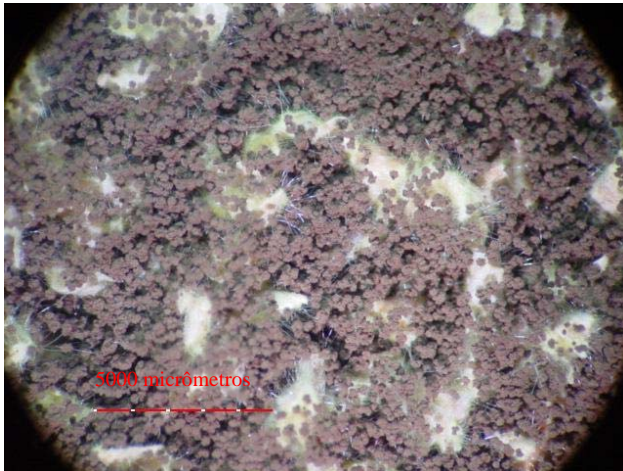


Figura 5.12: Imagem original adquirida do fungo *Aspergillus niger* 11T53A14 em fermentação em estado sólido após 48 horas de crescimento



Figura 5.13: Realce dos contornos da imagem 5.12 através de um filtro passa-alta

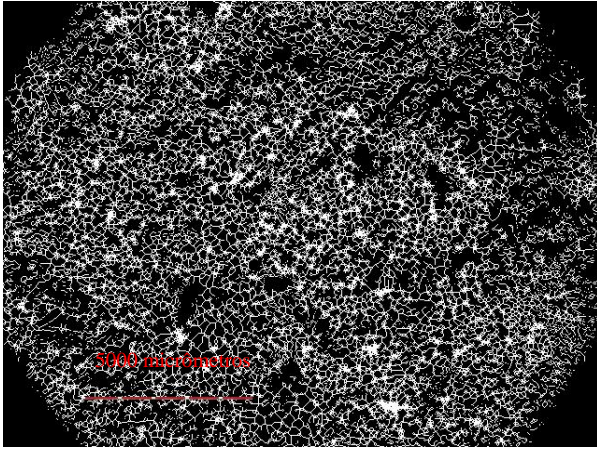


Figura 5.14: Quantificação da biomassa de *Aspergillus niger* 11T53A14 crescida após 48 horas de fermentação em estado sólido

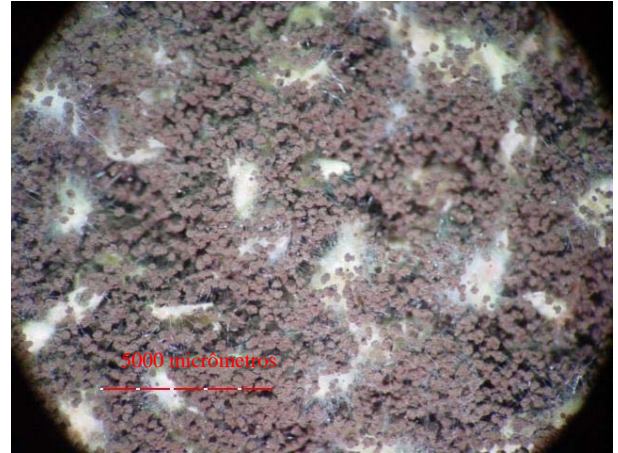


Figura 5.15: Imagem original adquirida do fungo *Aspergillus niger* 11T53A14 em fermentação em estado sólido após 72 horas de crescimento

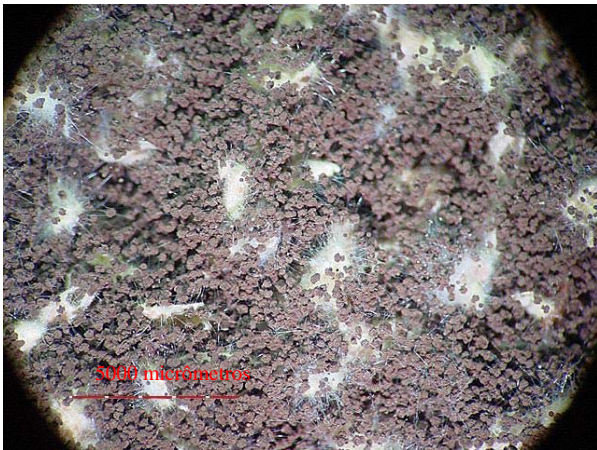


Figura 5.16: Realce dos contornos da imagem 5.15 através de um filtro passa-alta

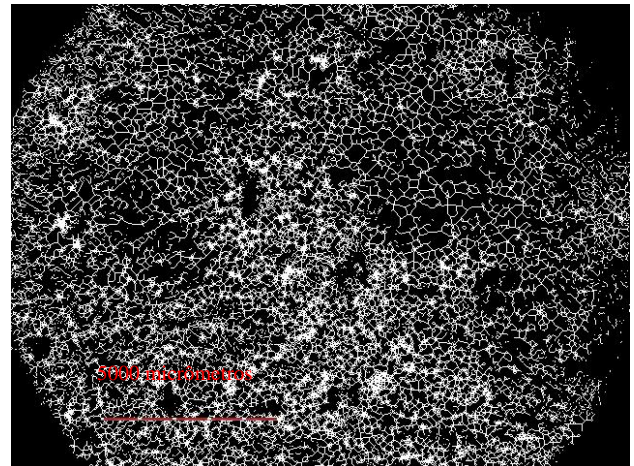


Figura 5.17: Quantificação da biomassa de *Aspergillus niger* 11T53A14 crescida após 72 horas de fermentação em estado sólido

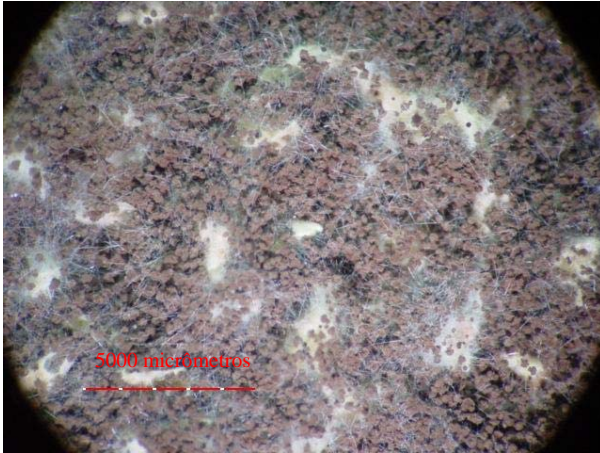


Figura 5.18: Imagem original adquirida do fungo *Aspergillus niger* 11T53A14 em fermentação em estado sólido após 96 horas de crescimento

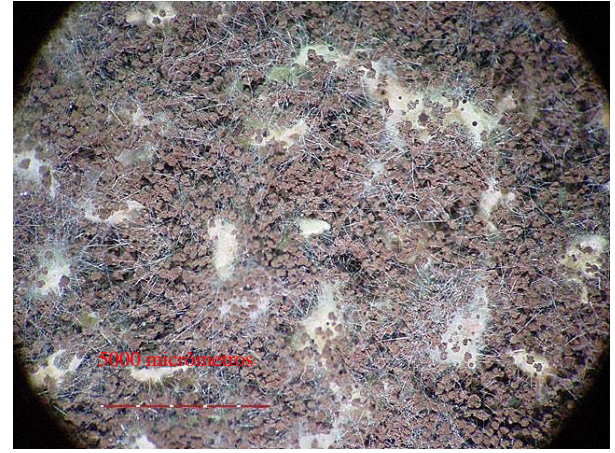


Figura 5.19: Realce dos contornos da imagem 5.18 através de um filtro passa-alta

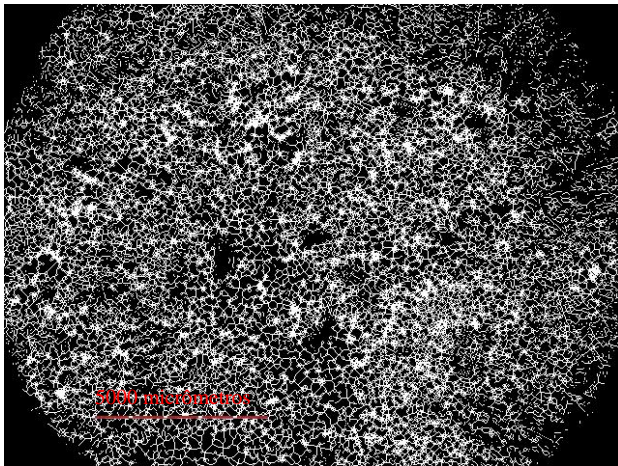


Figura 5.20: Quantificação da biomassa de *Aspergillus niger* 11T53A14 crescida após 96 horas de fermentação em estado sólido

A Figura 5.21 apresenta a análise estatística do crescimento do fungo ao longo do tempo de fermentação em estado sólido em função das áreas medidas, bem como os

resultados estatísticos do crescimento durante o processo fermentativo e entre os intervalos de tempo. Conforme ressaltado na seção de Materiais e Métodos, nos resultados apresentados já estão descontados o efeito do substrato (T_0). Com 95% de confiança, as variações serão consideradas significativas sempre que p (valor de significância) for menor que 0,05.

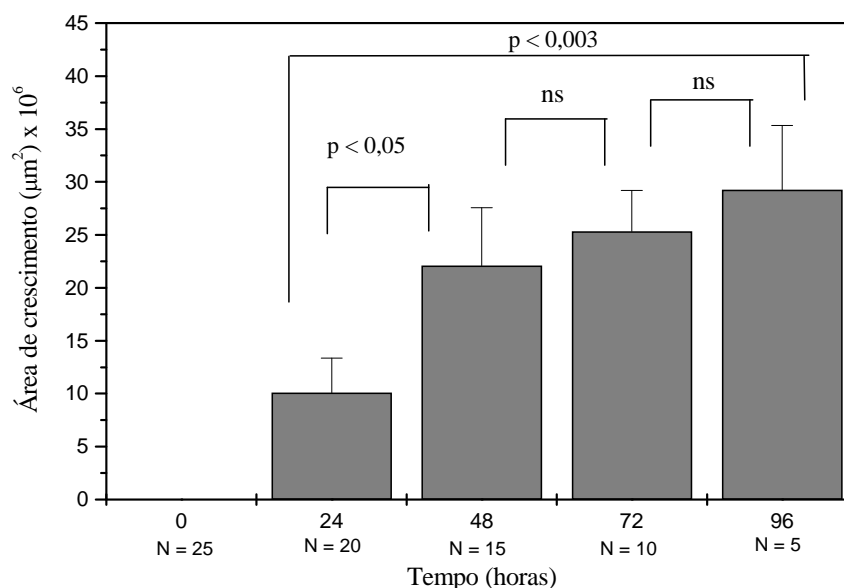


Figura 5.21: Análise estatística da área de crescimento do fungo *Aspergillus niger* 11T53A14 em fermentação em estado sólido com óleo de mamona (2% m/m), onde p é o valor de significância e ns é um valor não significativo

De acordo com a Figura 5.21, observa-se uma tendência significativa ($p < 0,003$) do crescimento da área recoberta pelas hifas entre os períodos de 24 e 96 h de fermentação, confirmando o que havia sido observado visualmente nas Figuras 5.8, 5.11, 5.14, 5.17 e 5.20. A avaliação do crescimento entre os tempos de fermentação demonstrou variação significativa de crescimento ($p < 0,05$) apenas entre os períodos de 24 e 48 h, embora uma

tendência não significativa (ns) de crescimento ainda possa ser notada entre os períodos de 48, 72 e 96 h. As Figuras 5.12, 5.15 e 5.18 apresentam as imagens originais adquiridas do meio em 48, 72 e 96 h de fermentação, respectivamente. É possível observar a crescente formação de esporos na superfície do meio, confundindo-se com as hifas. A sub-rotina desenvolvida contabilizou os esporos juntamente com as hifas, pois ambos são realçados pelo efeito do filtro passa-alta aplicado na etapa 2 do processamento (Figuras 5.13, 5.16 e 5.19, para os tempos de 48, 72 e 96 h, respectivamente), ocasionando, provavelmente, a semelhança estatística observada para estes tempos da Figura 5.21. Este efeito pode, possivelmente, vir a ser alterado pelo aprimoramento da sub-rotina utilizada. Além disso, o consumo de nutrientes pelo microrganismo durante a fermentação também pode ter contribuído para o resultado obtido.

5.3.2 – Determinação do teor de glicosamina

A determinação do teor de glicosamina é, ainda hoje, empregada como o método referencial para a determinação do crescimento da biomassa.

A variação do teor de glicosamina em função do tempo na fermentação é apresentada na Figura 5.22. A metodologia colorimétrica, usualmente empregada para a determinação indireta da concentração de biomassa através da glicosamina presente na parede celular dos fungos, também pode determinar outras substâncias com 6 átomos de carbono presente nos tecidos vegetais, como o farelo de trigo utilizado neste experimento, ocasionando resultados não acurados. Desse modo, os resultados da Figura 5.22 já estão subtraídos do valor do branco (farelo de trigo).

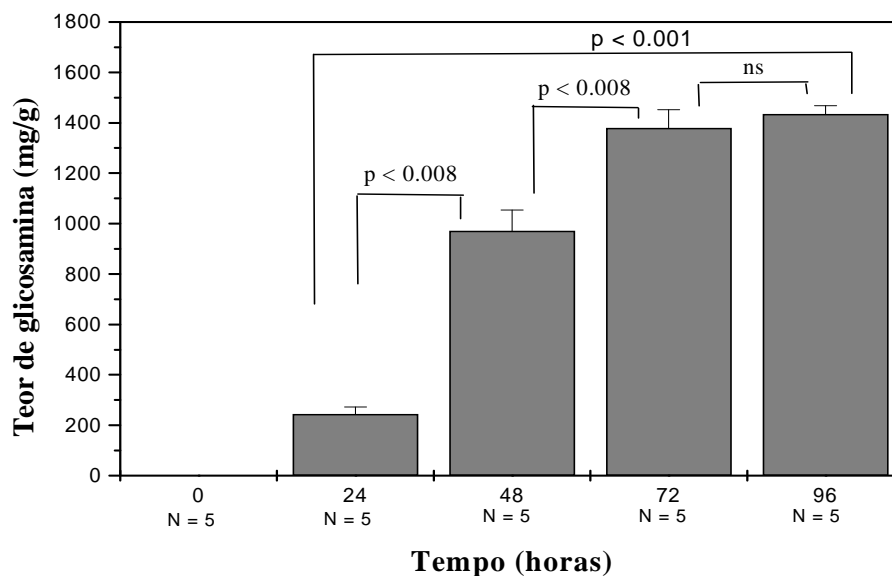


Figura 5.22: Análise estatística da determinação do teor de glicosamina presente no fungo *Aspergillus niger* 11T53A14, crescido em meio sólido contendo óleo de mamona (2% m/m) por 96 horas

A Figura 5.22 apresenta um perfil de uma curva de crescimento microbiano, apresentando um crescimento elevado até 72 horas, seguido por uma fase estacionária a partir desse tempo de fermentação. Um crescimento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) durante o tempo total de fermentação é mostrado pela análise do teor de glicosamina, como também entre os tempos 24 e 48 horas ($p < 0,008$) e 48 e 72 horas ($p < 0,008$) de fermentação. Após 72 horas, observa-se uma diferença não significativa (ns), provavelmente devido ao consumo dos nutrientes pelo microrganismo durante a fermentação. É interessante notar que o crescimento não significativo entre os períodos de 72 e 96 h também foi verificado para o crescimento da biomassa mensurado por processamento digital de imagens (Figura 5.21).

5.3.3 – Determinação da atividade enzimática da lipase

A produção de um metabólito pode ser relacionada com o crescimento microbiano. Na fermentação em estado sólido empregada neste trabalho, a atividade enzimática da lipase também foi usada como referência para verificar se a eficiência entre as metodologias utilizadas para quantificar o crescimento da biomassa poderiam ser correlacionadas com esta variável durante o processo. Espera-se, portanto que o crescimento microbiano possa corresponder ao aumento da produção de lipase.

A atividade da lipase variou significativamente entre 24 e 96 horas ($p < 0,0005$), como é apresentado na Figura 5.23 diferenças significativas entre todos os tempos de fermentação são identificadas ($p < 0,008$). Um máximo na produção de lipase pode ser observado no tempo de 72 horas, seguido por uma queda em 96 horas.

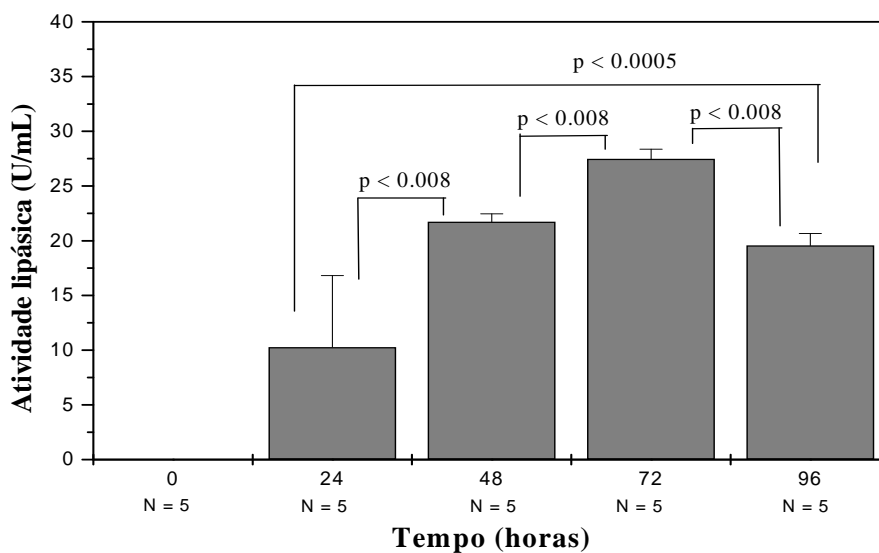


Figura 5.23: Análise estatística da atividade enzimática da lipase produzida pelo fungo *Aspergillus niger* 11T53A14 através da fermentação em estado sólido, utilizando óleo de mamona (2% m/m) como fonte suplementar de carbono

É importante notar que esse máximo não é observado nos resultados de medição da área de crescimento do fungo pelo processamento digital de imagens, nem na análise do teor de glicosamina (5.21 e 5.22, respectivamente). Porém, neste trabalho já foi ressaltada a presença de esporos recobrando a superfície do meio. Ambas as metodologias podem ter mensurado estes esporos e contabilizando-os como “dados” relacionados ao crescimento da biomassa, produzindo valores no tempo de 96 horas que não foram significativamente inferiores (se pensássemos apenas no consumo de nutrientes do meio), ou superiores àqueles obtidos em 72 horas de fermentação. Couri e colaboradores (2006b) observaram um efeito semelhante na produção de poligalacturonase através da fermentação em estado sólido usando o fungo *Aspergillus niger* 3T5B8. Os autores justificaram esse resultado considerando a produção de protease, que poderia estar hidrolisando a poligalacturonase produzida, causando a queda de sua atividade. O consumo de nutrientes do meio, associado à possível produção de protease (embora esta enzima não tenha sido quantificada no presente trabalho) poderiam provavelmente explicar o máximo da atividade enzimática verificada em 72 horas de fermentação. Assim, em função da melhor aplicação do método de quantificação de biomassa proposto, um aprimoramento do método seria necessário para evitar a contagem desses esporos durante o processamento digital de imagens.

Ul-Haq e colaboradores (2002) observaram que a máxima produção de lipase de *R. oligosporous* foi obtida no tempo de 48 horas. Segundo os autores, a diminuição na produção de lipase com maior tempo de fermentação pode ser decorrente da exaustão dos nutrientes ou da perda de umidade do meio fermentativo, o que também poderia ter ocorrido no presente trabalho.

A produção de lipase de *Pseudomonas aeruginosa* em fermentação em estado sólido usando torta de *Jatropha curcas* como substrato foi investigada por Mahanta e

colaboradores (2007). O máximo na produção de lipase foi observado no quinto dia após a inoculação. Segundo os autores, o substrato continha uma quantidade residual de gorduras e de ácidos graxos que podem ter atuado na lipase extracelular produzida na fermentação.

5.3.4 – Comparação entre os métodos de quantificação da biomassa

A determinação do teor de glicosamina é uma metodologia usualmente empregada para a comparação quando uma nova metodologia para a estimativa do crescimento da biomassa é proposta. Neste trabalho, espera-se que a área ocupada pelas hifas possa aumentar, em cada tempo de fermentação, em concordância com o aumento do teor de glicosamina na parede celular do fungo. Desse modo, os resultados obtidos com as duas metodologias foram comparados para se verificar se existia uma correlação entre os métodos estudados. Os resultados são apresentados na Figura 5.24, onde um coeficiente de correlação acima de 0,97 foi obtido.

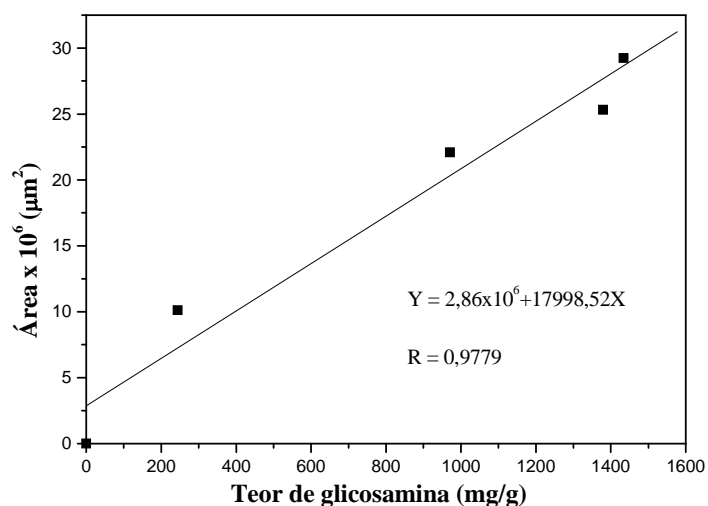


Figura 5.24: Correlação entre a metodologia do processamento digital de imagens e a determinação do teor de glicosamina

Couri e colaboradores (2006b) obtiveram, em estudo similar, um coeficiente de correlação aproximadamente 0,86, para a comparação entre as respostas mensuradas por processamento digital de imagens e dosagem do teor de glicosamina, sendo este resultado considerado satisfatório para os dados obtidos a partir de meios biológicos. No presente trabalho, a sub-rotina proposta propiciou resultados que são ainda mais coerentes com aqueles verificados a partir das análises do teor de glicosamina. É válido ressaltar que a atual sub-rotina mediu também a área de esporos juntamente com as das hifas, o que poderia resultar em uma elevada discrepância entre os resultados. Essa diferença foi observada de forma sutil nos resultados apresentados na Figura 5.21 e 5.22. No entanto, esse efeito não pareceu ter influenciado significativamente a correlação obtida.

Adicionalmente, a aquisição das imagens sempre a partir do mesmo ponto e a inclusão de uma sub-rotina para o tempo inicial permitiram que os dados mensurados a partir de 24 horas de fermentação pudessem ser subtraídos da resposta do substrato, o que possivelmente contribuiu para a melhor qualidade dos resultados obtidos.

A Figura 5.25 apresenta o resultado dessas correlações.

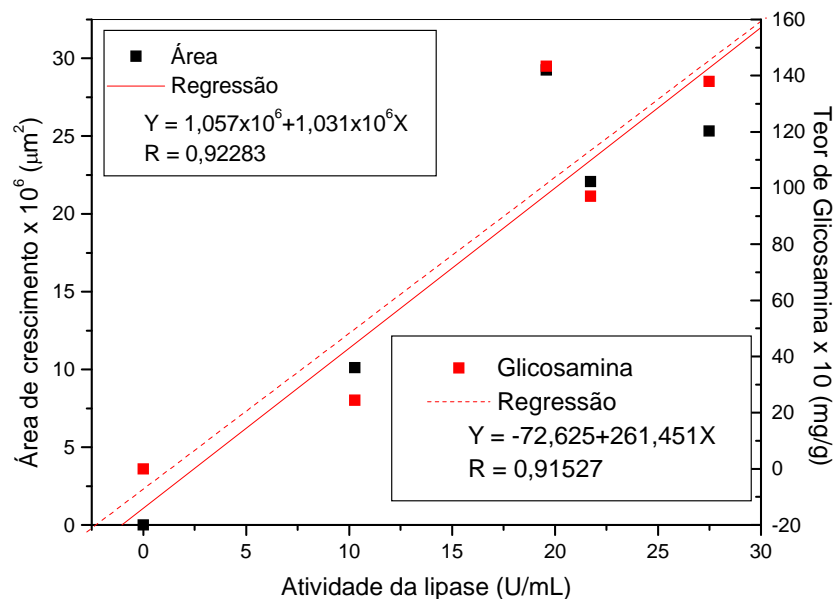


Figura 5.25: Correlação entre a atividade enzimática da lipase e os métodos de quantificação indireta da biomassa pela determinação do teor de glicosamina e o processamento digital de imagens

Pode-se observar que ambas as retas apresentam um coeficiente de correlação acima de 0,9, mostrando uma relação direta e linear entre as duas metodologias usadas para determinar o crescimento da biomassa e a atividade enzimática da lipase. É interessante lembrar que um máximo de produção de lipase ocorreu em 72 horas de fermentação, não sendo esse ponto verificado por qualquer uma das metodologias de quantificação de biomassa estudada (Figuras 5.21 e 5.22). Ainda assim, a correlação entre o crescimento da biomassa e a produção de lipase pode ser observada.

5.4 – Determinação da atividade de esterificação da lipase imobilizada de *A.niger* 11T53A14

Uma das restrições relacionadas à utilização de enzimas em processos industriais é o custo do biocatalizador.

Sendo assim, é importante a produção de uma enzima de baixo custo e com boa capacidade catalítica para viabilizar a sua utilização como catalisadores de processos industriais. Neste trabalho, a lipase de *A.niger* 11T53A14 obtida foi imobilizada e, em seguida, avaliada em relação a sua capacidade catalítica em reações de esterificação em meio microaquoso.

A reação para determinação da atividade de esterificação da lipase imobilizada escolhida foi a reação de síntese de oleato de butila, empregando ácido oléico e butanol, na razão estequiométrica dos reagentes e 3% m/m de enzima, a 45°C. A reação de esterificação também foi conduzida na presença de hexano (50% v/v).

A atividade enzimática foi determinada pela velocidade inicial de reação na síntese de oleato de butila no sistema sem solvente e no meio reacional contendo 50% v/v de hexano, e os valores obtidos foram, respectivamente, 120 U/g e 650 U/g. Desta forma, verificou-se que a lipase apresenta considerável atividade de esterificação e que na presença de hexano a atividade da lipase foi cerca de 5 vezes maior. Segundo Nie e colaboradores (2006), solventes não polares, tais como o hexano ($\log P = 3,5$), não são capazes de retirar a água essencial ao redor da enzima, presente na forma de camadas microaquosas, o que preserva a conformação ativa da enzima e, conseqüentemente, sua capacidade catalítica.

Na Figura 5.26, a conversão de ácido oléico, na reação de síntese de oleato de butila, em função do tempo de reação, empregando a lipase imobilizada de *A.niger* 11T53A14, em meio com e sem solvente, é apresentada. Para comparação, foi utilizada,

como reação controle, o experimento realizado com a lipase comercial imobilizada de *Rhizomucor miehei*, Lipozyme RM IM (Novozymes A/S). Pode-se observar que a lipase de *A.niger* 11T53A14 apresentou após 45 minutos, na presença de hexano a 50%v/v, conversão de 28%, enquanto que a Lipozyme RM IM permitiu a obtenção de 68%, mostrando, portanto, um potencial para aplicação da lipase de *A.niger* 11T53A14 em reações de síntese. Na ausência de hexano 50% (v/v), a conversão caiu drasticamente após 30 minutos de reação, indicando que a presença deste solvente aumenta a estabilidade da lipase de *Aspergillus niger* 11T53A14.

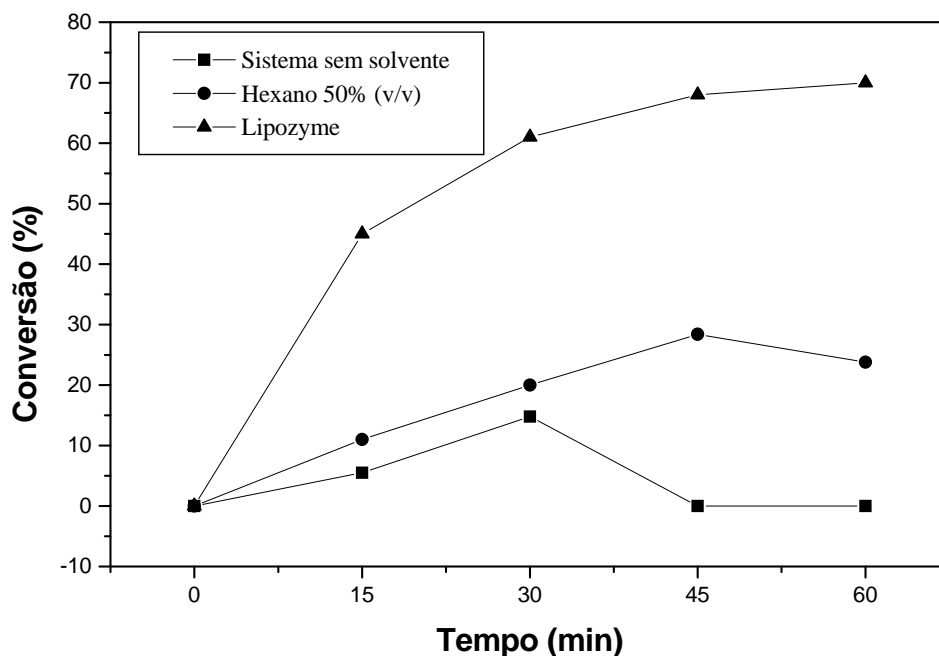


Figura 5.26: Conversão de ácido oléico na reação de esterificação entre ácido oléico e butanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e lipase (3% m/m), a 45°C, em meio com e sem hexano (50% v/v), comparada a conversão pela lipase comercial.

5.5 – Produção de biodiesel utilizando lipase imobilizada de *A.niger* 11T53A14

Para viabilizar a produção de biodiesel pela rota enzimática é indispensável minimizar o custo do biocatalisador. Neste sentido, considerando que a lipase de *A.niger* 11T53A14, obtida a partir de rejeitos agroindustriais, apresentou uma considerável atividade de esterificação, investigou-se o seu potencial como biocatalisador da produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo de soja com etanol a 40°C.

Como esse experimento foi uma avaliação inicial da atividade de transesterificação da lipase obtida, ele foi conduzido em condições reacionais que não são as ótimas encontradas para lipases comerciais imobilizadas (BERNARDES et al., 2007). Além disso, visto que a lipase imobilizada de *A.niger* 11T53A14 apresentou melhor performance catalítica em meio com hexano a 50% v/v, a reação de transesterificação também foi avaliada na presença deste solvente, mesmo ciente de que o uso de solventes orgânicos não é indicado para a produção do biodiesel devido ao alto risco de explosão e à necessidade de uma etapa adicional para a remoção do solvente.

Uma vez que tanto o metanol quanto o etanol podem ser utilizados na produção de biodiesel, a transesterificação enzimática do óleo de soja com etanol foi realizada nesta tese. No Brasil, a produção de ésteres etílicos é uma tecnologia sustentável, já que o etanol pode ser facilmente produzido pela fermentação de açúcares.

Para alcançar a completa conversão dos triglicerídeos nos seus correspondentes ésteres etílicos é necessário, pelo menos, que seja utilizada a quantidade estequiométrica de etanol, isto é razão molar etanol/óleo de soja igual a 3. A adição de excesso de etanol acarreta na desativação da lipase, visto que este álcool é uma substância altamente hidrofílica. Além disso, de acordo com Bernardes e colaboradores (2007), para evitar a desativação da lipase pela alta concentração inicial de álcool na reação, a adição de etanol

deve ser realizada de forma escalonada (em três etapas sucessivas em 0, 30 e 60 minutos de reação).

Desta forma, as reações de transesterificação foram conduzidas com lipase imobilizada a 7% m/m, a 40°C, utilizando a razão estequiométrica dos reagentes e com adição escalonada de etanol. Para avaliar o potencial catalítico da lipase imobilizada de *A.niger* 11T53A14, uma reação controle foi também realizada empregando Lipozyme RM IM. Os resultados estão apresentados na Figura 5.27.

De acordo com os resultados ilustrados na Figura 5.27, pode-se observar que a produção de biodiesel por via enzimática acarretou em rendimento em ésteres etílicos de 45% após 2 horas de reação, quando Lipozyme RM IM foi utilizada. No entanto, nas reações empregando a lipase imobilizada de *A.niger* 11T53A14, o rendimento máximo em biodiesel obtido foi de 2,4%, mesmo na presença de hexano.

Yang e colaboradores (2007) também investigaram a capacidade de transesterificação de lipases e observaram que a lipase de *A.niger* A6 estudada não apresentou atividade na reação de produção de biodiesel.

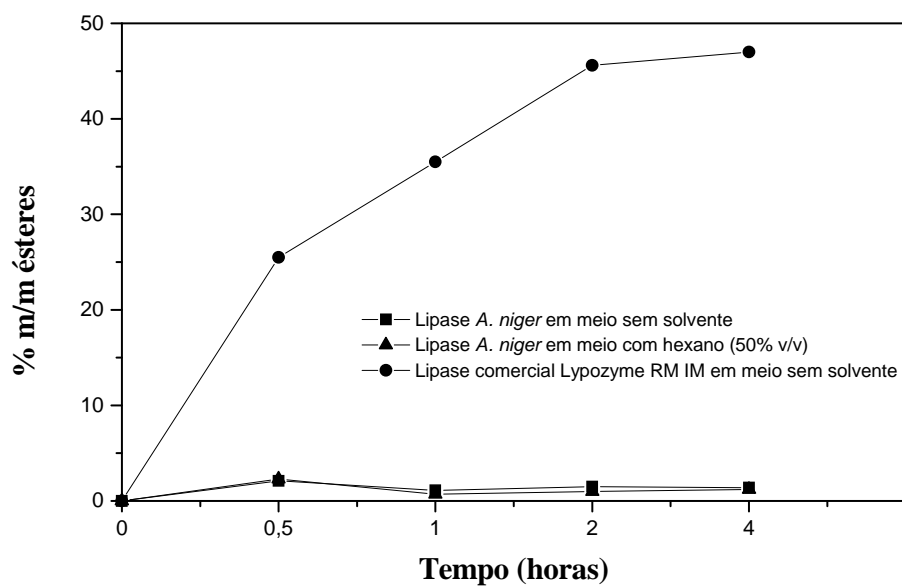


Figura 5.27: Produção de biodiesel utilizando razão molar etanol/óleo de soja igual a 3, com adição escalonada do etanol, 7% m/m de lipase imobilizada, a 40°C, comparada à produção por uma lipase comercial.

6 – Conclusões

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, as principais conclusões obtidas podem ser observadas a seguir:

1. A produção de lipase *A. niger* 11T53A14 em fermentação em estado sólido, usando farelo de trigo como suporte foi observada mesmo em ausência de uma fonte suplementar de carbono. Neste caso, as melhores condições para a produção da enzima foram obtidas com 60% de umidade.
2. Empregando meios de fermentação com 60% de umidade, vários óleos vegetais foram testados como fontes de carbono suplementar, sendo que com 2% m/m de óleo de mamona observou-se o máximo na atividade lipásica (24,62 U/mL).
3. Os resultados obtidos mostraram que o processamento digital de imagens pode ser uma promissora ferramenta para a estimativa da biomassa produzida em meio de fermentação em estado sólido, através da medição das áreas das hifas das imagens digitalmente aquisitadas. A correlação entre a metodologia proposta e a determinação de glicosamina (metodologia mais empregada) foi elevada (aproximadamente 0,98), sendo considerada satisfatória, levando-se em conta que trata-se da medida de dados biológicos. Além disso, a correlação entre os resultados de processamento digital de imagens e a atividade de lipase também foi considerada elevada (0,92), concordando que o parâmetro mensurado (área das hifas) poderia ser empregado para monitorar o crescimento do fungo em fermentação em estado sólido.
4. A lipase imobilizada de *A. niger* 11T53A14 apresentou considerável atividade de esterificação (6.000 U/g), determinada a partir da reação de síntese de oleato de butila, tendo seu valor aumentado 2,1 vezes na presença de hexano a 50% v/v.
5. O rendimento de biodiesel, na reação de transesterificação de óleo de soja com etanol, empregando a lipase imobilizada, foi muito baixo em meio com e sem hexano(50% v/v), atingindo seu máximo em aproximadamente 2,4%.

7 – Sugestões

- Testar outras fontes de carbono suplementar, com a finalidade de se conhecer o benefício causado na produção de lipase pelo fungo em meio sólido.
- Testar novas técnicas para imobilização da lipase e investigar a sua atividade em reações de síntese e sua especificidade em relação à vários tipos de substratos.
- Determinar a síntese de protease no meio de cultura para verificar a sua influência no decréscimo da atividade lipásica com o aumento do tempo de reação.
- Caracterizar a lipase obtida em relação a sua seletividade em relação ao substrato (álcool, ácido graxo), à temperatura etc.

8 – Referências bibliográficas

BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. “Sensors and measurements in solid state fermentation: a review”. *Process Biochemistry*, vol. 38, pp. 881-896, 2003.

BENJAMIM, S.; PANDEY, A. “Isolation and characterization of three distinct forms of lipase from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation”. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol.44, N.2, pp. 213 – 221, 2001.

BERNARDES, O. L.; BEVILAQUA, J. V.; LEAL, M. C. M. R.; FREIRE, D. M. G., LANGONE, M. A. P. “Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 136-140, pp. 105-114, 2007.

BEVILAQUA, J., V. *Estudo da catálise enzimática em meio orgânico para a produção de protótipo de fármaco antiasmático*. Tese* de D. Sc. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2005.

BIANCHI, V. L. D.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. *Fermentação em estado sólido. Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*, 1ª edição, Edgard Blücher Ltda., 2001, vol. 2, p. 247-276.

BLIX, S. “The determination of hexosamine according Elson and Morgan”, *Acta Chemica Scandinavica*, vol. 2, pp. 467-478, 1948.

BON, E. P. S.; PEREIRA JR., N. *Tecnologia enzimática*, Rio de Janeiro, 1999.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT’ANNA JR., G. L.; FREIRE, D. M. G. “Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state fermentation”. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 4, pp. 239 – 247, 2000.

CAVALCANTI, E. D. C.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R.; SANT’ANNA JUNIOR, G. L. “Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors”. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 48, Special n., pp. 79 – 84, 2005.

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

CORZO, G.; REVAH, S. “Production and characterization of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681”. *Bioresource Technology*, vol. 70, pp. 173 – 180, 1999.

COURI, S.; DAMASO, M. C. T.; DUTRA, J. C. V. *Avaliação da produção de lipase por Aspergillus niger 11T53A14 em colunas aeradas por fermentação semi-sólida. In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 08-11 Outubro, 1921, Curitiba, PR, Brasil, 2006a.*

COURI, S.; MERCES, E. P.; NEVES, B. C. V.; SENNA, L. F. “Digital image processing as a tool to monitor biomass growth in *Aspergillus niger* 3T5B8 solid-state fermentation: preliminary results”. *Journal of Microcopy*, vol. 224, pp. 290-297, 2006b.

COURI, S., PINTO, G.A.S., SENNA, L.F. & MARTELLI, H.L. “Influence of metal ions on pellet morphology and polygalacturonase synthesis by *Aspergillus niger* 3T5B8”. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 34, pp. 16–21, 2003.

COURI, S.; FARIAS, A.X. “Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes”. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 26, pp. 314–317, 1995.

COURI, S., *Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por Aspergillus niger mutante 3T5B8*. Tese* de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 1993.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. “Application of solid state fermentation to food industry – a review”. *Journal of Food Engineering*, vol. 76, pp. 291-302, 2006.

COX, P.W.; THOMAS, C. R.. “Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis”. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 39, pp. 945-952, 1992.

D’AGOSTINI, D., *Obtenção de lipídios estruturados por interesterificação de trigliceróis de cadeia média e longa*. Tese* de D.Sc. Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP, São Paulo, SP, Brasil, 2001.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. “Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*”. *Enzyme and Microbiol Technology*, vol. 26, pp. 657-663, 2000.

DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A. ; FREITAS, S. C. ; COURI, S. *Produção de Lipases por fermentação semi-sólida tendo como indutores da síntese, subprodutos do refino do óleo de milho. In: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos-SINAFERM, 2005, Recife-PE. Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, p. 1-7, 2005.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; DOS SANTOS, J. C.; DE AGUIAR, C. L. “Modificação de óleos e gorduras por biotransformação”. *Química Nova*, vol. 27, N. 1, pp. 146 - 156, 2004.

DOMINGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M. A.; SANROMÁN, A. “A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*”. *Biotech. Letters*, vol. 25, pp. 1225-1229, 2003.

DOSSAT, V.; COMBES, D., MARTY, A. “Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil”. *Enzyme Microbial and Technology*, vol. 30, pp. 90–94, 2002.

DURAND, A. “Bioreactors design for solid state fermentation”. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 13, pp. 113 – 125, 2003.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. “Biodiesel fuel production by transesterification of oils”. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 92, pp. 405–416, 2001.

GERMANO, S., *Desenvolvimento de bioprocessos para a produção, caracterização e pirificação de proteases de Penicillium sp, por fermentação no estado sólido*. Tese* de D.Sc., Setor de Tecnologia/UFPR, Curitiba, PR, Brasil, 2000.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. “The role of water in solid state fermentation”. *Biochemistry Engineering Journal*, vol. 13, pp. 85-101, 2003.

GOMBERT, A. K.; PINTO, A. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. “Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state fermentation using babassu oil cake as substrate”. *Process Biochemistry*, vol. 35, pp. 85 – 90, 1999.

GOMES, C. A.O., *Produção de enzimas despolimerizantes por fermentação em meio semi-sólido por Aspergillus niger mutante 3T5B8*. Tese* de M.Sc., Departamento de Tecnologia de Alimentos, IT/UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil, 1995.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E., *Digital image processing*. New Jersey, Prentice Hall, 2001.

GUNSTONE, F. D. “Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids”. *Journal Science Food Agricultural*, vol. 79, n. 12, pp. 1535-1549, 1999.

HÖLKER, U.; LENZ, J. “Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages?”. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 8, pp. 301 – 306, 2005.

HOU, C. T., *Handbook of industrial catalysis*. CRC Press – Taylor & Francis Group. Boca Raton, Flórida, Estados Unidos da América, 2005.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. “Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 16, pp. 53–58, 2001.

JAEGER, K-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. “Bacterial biocatalysis: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases”. *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 53, pp. 315 – 351, 1999.

KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVAKRISHNAN, R. “Lipase production from *Aspergillus niger* by solid state fermentation using gingelly oil cake”. *Process Biochemistry*, vol. 33, N. 5, pp. 505 – 511, 1998.

KÖSE, Ö.; TÜTER, M.; AKSOY, H. A. “Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalysed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium”. *Bioresource Technology*, vol. 83, pp. 125–129, 2002.

LANGONE, M. A. P., *Síntese de triglicéridios catalisada por lipase*. Tese* de D.Sc., COPPE / UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1998.

LEE, K. T.; AKOH, C. C. “Characterization of enzymatically synthesized structured lipids containing eicosapentaenoic, docosahexaenoic, and caprylic acids”. *Journal Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, vol. 75, N. 4, pp. 495 – 499, 1998.

LI, D.; WANG, B.; TAN, T. “Production enhancement of *Rhizopus arrhizus* lipase by feeding oleic acid”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 43, pp. 40-43, 2006.

MAHADIK, N. D.; TAMBEKAR, U. S.; BASTAWADE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. “Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation”. *Process Biochemistry*, vol. 38, pp. 715 – 715, 2002.

MARQUES FILHO, O.; VIEIRA NETO, H., *Processamento digital de imagens*. Brasport, 1999.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. “Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 10, pp. 248-268, 2006.

MURALIDHAR, R. V.; CHIRUMAMILA, R. R.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. “A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources”. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 9, pp. 17 – 23, 2001.

MURTHY, M. V. R.; THAKUR, M. S.; KARANTH, N. G. “Monitoring of biomass in solid state fermentation using light reflectante”. *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 8, pp. 59-63, 1993.

NEVES, B. C. V., *Monitoramento do crescimento do Aspergillus niger 3T5B8 em fermentação semi-sólida usando a técnica de análise de imagem*. Tese* de M.Sc. Instituto de Tecnologia / UFRRJ. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2003.

NEVES, B. C. V.; SENNA, L. F.; COURI, S. *Monitoramento da cinética de crescimento do Aspergillus niger 3T5B8 em fermentação semi-sólida usando processamento digital de imagens*. In: *Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações*, 5 a 8 de agosto, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 2003.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. "Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil". *Bioresource Technology*, vol. 96, pp. 769-777, 2005.

OLIVEIRA, D.; FEHIRMANN, A. C.; DARIVA, C.; CUNHA, A. G.; BEVILAQUA, J. V.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, V.; FREIRE, D. M. G. "Influence of compressed fluids treatment on the activity of Yarrowia lipolytica lipase". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 39, pp. 117-123, 2006.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. "Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases". *Enzyme and Microbiol Technology*, vol. 27, pp. 187-204, 2000.

PANDEY, A. "Solid state fermentation". *Biochemical Engineering Journal*, vol. 3, pp. 81 – 84, 2003.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G .B. "Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de Rhizopus sp". *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 23, pp. 135-140, 2003.

PEÑALOZA, W.; DAVEY, C. L.; KELL, D. B.; HEDGER, J. N. "Real time monitoring of the accretion of Rhizopus oligosporus biomass during the solid substrate tempeh fermentation". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol.7, pp. 248-259, 1991.

PENMAN, D.; BRITTON, G.; HARDWICK, K.; COLLIN, H. A.; ISAAC, S. "Chitin as a measure of biomass of Crinipellis perniciososa, causal agent of witches' broom disease of Theobroma cacao". *Mycology Research*, vol. 104, pp. 671-675, 2000.

PEREIRA, E.B.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. "Kinetic studies of lipase from Candida rugosa: a comparative study between free and enzyme immobilized onto porous chitosan beads". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 91-93, pp. 739-752, 2001.

PETKAR, M.; LALI, A.; CAIMI, P.; DAMINATI, M. “Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis”. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, pp.1 – 8, 2006.

PINTO, G. A. S., *Produção de uma mistura enzimática hidrolítica por Aspergillus niger 3T5B8 em fermentação submersa*. Tese* de M.Sc., IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1998.

RAIMBAULT, M. “General and microbiological aspects of solid substrate fermentation”. *Electronic Journal of Biotechnology*, ISSN: 0717-3458, vol. 1, n.3, 1998.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. “Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation”. *Biochemistry Engineering Journal*, vol. 13, pp. 197-203, 2003.

RODRIGUEZ, J. A.; MATEOS, J. C.; NUNGARAY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. “Improving lipase production by nutriente source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation”. *Process Biochemistry*, vol. 41, pp. 2264-2269, 2006.

SAKURAY, Y.; LEE, T. H.; SHIOTA, H. “On the convenient method for glucosamine estimation in Koji”. *Agricultural Biological Chemistry*, vol. 41, pp. 619-624, 1977.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SALINAS, V. “Biodiesel production from triolein and short chain alcohols trough biocatalysis”. *Journal of Biotechnology*, vol. 119, pp. 291 – 299, 2005.

SATO, K.; SUDO, S. *Manual of industrial microbiology and biotechnology – Small scale solid state fermentations*. 2^a edition, Washington, 1999, p. 61-79.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., *Biotechnologia industrial*. 1^a ed., São Paulo, SP, 2001, Edgard Blücher LTDA,.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. “Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in solvent free system”. *Process Biochemistry*, vol. 42, pp. 409-414, 2007.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. “Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase”. *Journal of the American Oil Chemists Society*, vol. 76, pp. 789–793, 1999.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. “Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and applications of the reaction to oil processing”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 42, pp. 409-414, 2007.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. "Improvement in lipase-catalysed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil". *Enzyme Microbial and Technology*, vol. 33, pp. 97–103, 2003.

SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. "Triglycerides-based diesel fuels". *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, vol. 4, pp. 111–133, 2000.

STRAATHOF, A. J. J.; ADLERCREUTZ, P., *Applied biocatalysis*, 2^a. ed. Harwood Academic Publishers, Holanda, 2000.

SVENDSEN, A. "Lipase protein engineering". *Biochimica et Biophysica Acta*, n. 1543, pp. 223-228, 2000.

TUCKER, K. G.; KELLY, T.; DELGRAZIA, P.; THOMAS, C. R. "Fully-automatic measurement of micelial morphology by image analysis". *Biotechnology Progress*, vol. 8, pp. 353-359, 1992.

UL-HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA, M. I. "Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid state fermentation". *Process Biochemistry*, vol. 37, pp. 637 – 641, 2002.

VIEIRA, A. P. A., *Síntese de ésteres monoalquílicos de ácido palmítico utilizando lipases imobilizadas e zeólitas*. Tese* de M.Sc. Escola de Química / UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2005.

VIEIRA, A. P. A.; DA SILVA, M. A. P.; LANGONE, M. A. P. *Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase*. In: *ENPROMER, 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering, 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering*.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. "Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 9, pp. 113-148, 2000.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. "Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 78, pp. 703-707, 2001.

YANG, Z.; RUSSEL, A. J., *Fundamentals of non-aqueous enzymology*. In: *Koshinen, A.M.D.; Klibanov, A.M. (eds), Enzymatic Reactions in Organic Media*, 1 ed., London, Blackie Academic & Professional, chapter 3, 1996.

ZENG, J.; DU, W.; LIU, X.; DEHUA, L.; DAÍ, L. "Study on the effect of cultivation parameters and pretreatment on *Rhizopus oryzae* cell-catalyzed transesterification of vegetable oils for biodiesel production". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 43, pp. 15-18, 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)