



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Eduardo Oliveira Ignácio

Produção de lipase por fermentação em estado sólido em biorreator
de leito fixo

São José do Rio Preto
2013

Eduardo Oliveira Ignácio

Produção de lipase por fermentação em estado sólido em biorreator
de leito fixo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Engenharia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. João Cláudio Thoméo

São José do Rio Preto
2013

Ignácio, Eduardo Oliveira
Produção de lipase por fermentação em estado sólido em biorreator
de leito fixo / Eduardo Oliveira Ignácio. - São José do Rio Preto: [s.n.],
2013.

66 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: João Cláudio Thoméo
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Lipase. 2. Fermentação em estado sólido. 3. Fungos. I. Thoméo,
João Cláudio. II. Ignácio, Eduardo Oliveira. III. Universidade Estadual
Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 582.28

Eduardo Oliveira Ignácio

Produção de lipase por fermentação em estado sólido em biorreator
de leito fixo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Engenharia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Márcia Luiza Rizzatto
IFSP – Campus Avançado Matão

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 06 de fevereiro de 2013

Dedico esta conquista aos meu pais, Edson de Sousa Ignácio e Dalva de Fátima Oliveira Ignácio, pela compreensão, incentivo, amor e principalmente pelo exemplo que sempre me deram. Pois através do suor de seus esforços, hoje posso plantar e colher meus próprios frutos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me levado além do deserto, a uma jornada de intenso crescimento como homem e como profissional, me auxiliando a definir objetivos, e o que é realmente importante na vida. Foi impossível não sentir suas mãos a me guiar todos os momentos.

À Nossa Senhora, que intercedeu e intercede por mim sem cessar, exemplo e modelo de proceder.

Ao meu orientador, Professor Dr. João Cláudio Thoméo, pela amizade, confiança e principalmente pela paciência. Pelos ensinamentos valiosos que me transmitiu, pelo incentivo nas horas difíceis e por sempre ser tão acessível e solícito com todos.

À minha família, base para tudo, aos meus pais Edson e Dalva, Deus me permita ser para meus futuros filhos, exemplo como vocês são a nós; aos meus irmãos Douglas e Cleber pela amizade e carinho.

À Jaqueline, minha futura esposa, pela paciência, pela compreensão e por dividir angústias, alegrias e sonhos.

Às minhas cunhadas, tios, tias, primos, avós, sogro e sogra que sempre estiveram juntos torcendo, rezando e apoiando em todos os momentos

Aos amigos dos Laboratórios de Bioprocessos, Bioquímica e Microbiologia: Alex, Teresa, Lina, Fernanda, Vivi, Isabela, Leandra, Victor, Tiago, Janaína, Ana Lúcia, Priscila, Dani, Camila, Patrícia, Juliana, Rafael, Yara e Yuri pelos ensinamentos, pela companhia nas manhãs, tardes, noites e madrugadas, pelas risadas, por dividir a ansiedade, as alegrias e frustrações dos resultados de cada experimento.

À Teresa, que sempre cuida de todos nós como filhos, pelos conselhos, pelo carinho e pela amizade durante todos esses anos.

Aos professores Dr^a. Márcia Luzia Rizzatto, Dr. Roberto da Silva , Dr^a Milla Alves Baffl e Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz que aceitaram o convite de compor a banca de avaliação desta dissertação, pela atenção e consideração para comigo e com professor João e pelas valiosas contribuições.

À professora Dr^a. Maria Aparecida Mauro, coordenadora da Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos e a todos da Seção Técnica de Pós-Graduação, na figura de Rosemar Rosa de Carvalho Brena e Silvia Emiko Kazama; muito obrigado, sei que vocês fizeram por mim mais do que até mesmo poderiam fazer.

À todos os professores, técnicos e funcionários do Instituto, por nos proporcionarem um ambiente altamente estimulante e acolhedor.

Às amigos que tornaram essa caminhada muito prazerosa: Larissa, Beatriz, Evandro, Cleyson e Ana Paula, a todo o pessoal do GOU “Unidos no Espírito”, ao grupo de oração “São Padre Pio” e à toda a comunidade da Paróquia Nossa Senhora de Fátima.

À todos do Acampamento da Paróquia Nossa Senhora do Rosário de Pompéia – SP, em especial à toda equipe do Acampamento FAC, pelo carinho, pela amizade, pelos exemplos e por me edificarem.

Aos Professores Dr. Waldir Barros Fernandes Jr e Dr. Fábio Roberto Leonel e a todos os colegas e alunos da FATEC campus São José do Rio Preto, pela experiência e crescimento que tem me proporcionado.

Aos meus médicos, que cuidaram da minha saúde, Dr. Geraldo B. Gentile Stefano e Dra. Luciana Cavallari e todos os enfermeiros da Santa Casa de Marília, pelo carinho e por me colocarem em condições de jogo rapidamente.

*“Nada temas, porque estou contigo, não lances olhares
desesperados, pois eu sou teu Deus; eu te fortaleço e venho em
teu socorro, eu te amparo com minha destra vitoriosa.”*
Isaías 41.10

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo produzir enzimas lipolíticas por fermentação em estado sólido em um biorreator de leito fixo, empregando para isso o fungo mesofílico *Metarhizium anisopliae* ICB 421 e o fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, utilizando como substrato bagaço de cana de açúcar (BC), farelo de trigo (FT) e grãos de soja moída (S). As enzimas produzidas podem ser utilizadas para diversos fins industriais, entre eles a produção de biodiesel. Os testes para produção de enzimas foram realizados inicialmente em sacos de polipropileno e apresentaram para *M. anisopliae* atividade lipolítica de 13,71 U/gss a 28 °C, em meio composto por 50% BC, 25% FT e 25% S, com umidade de 70% e cultivado por 5 dias; para *T. indicae-seudaticae* atividade lipolítica de 2,81 U/gss a 45 °C, em meio composto por 50% BC, 25% FT e 25% S, com umidade de 70% e cultivado por 2 dias. Nestes ensaios, as variáveis testadas, composição do meio, umidade inicial, substituição do óleo de soja por farelo de soja e tempo de fermentação, afetaram a atividade das enzimas obtidas. Na sequência, como parte do aumento de escala, os ensaios foram conduzidos em dois biorreatores de leito fixo, tendo-se como variáveis a vazão de ar e a umidade inicial do substrato, sendo que ambas afetaram a atividade enzimática, que atingiu 5,61 U/gss para *M. anisopliae* a 28 °C, em meio composto por 50% BC, 25% FT e 25% S, com umidade de 70%, vazão ar 180 L/h, cultivado por 5 dias, e 2,48 U/gss para *T. indicae-seudaticae* a 45°C, em meio composto por 50% BC, 25% FT e 25% S, com umidade de 70%, vazão ar 80 L/h, cultivado por 2 dias. Das enzimas produzidas, a de *M. anisopliae* apresentou valores muito baixos de transesterificação, descartando-a para a aplicação na obtenção de biodiesel, mas a de *T. indicae-seudaticae* mostrou-se promissora para esta aplicação.

Palavras-chave: Lipase, *Metarhizium anisopliae*, *Thermomucor indicae-seudaticae* e fermentação em estado sólido (FES).

ABSTRACT

This study aimed to produce lipolytic enzymes through solid state fermentation (SSF) in a fixed-bed bioreactor, using Metarhizium anisopliae ICB 421 mesophilic fungi and Thermomucor indicae-seudaticae N31 thermophilic fungi, and sugar cane bagasse, wheat, and soybeans as substrate. The enzyme produced can be used for various industrial purposes, including biodiesel production. Tests for enzyme production initially performed in polypropylene and showed to M. anisopliae lipolytic activity of 13.71 U / gds at 28 ° C in medium composed of 50% BC, and 25% FT 25% S, with 70% humidity and cultivated for 5 days for T. indicae-seudaticae lipolytic activity of 2.81 U / gds at 45 ° C in medium composed of 50% BC, and 25% FT 25% S, with 70% humidity and cultivated for 2 days. In these assays, the variables tested, medium composition, initial moisture, replacement of soybean oil by soybean meal and fermentation time, affected the activity of the enzymes obtained.

Furthermore, as part of scaling, tests were conducted in a fixed bed bioreactor, testing again the process conditions for optimizing the production of lipase; the variables used in this step were air flow, and initial substrate moisture, both of which affect the enzymatic activity, that reached 5.61 U/gds to M. anisopliae at 28°C in medium composed of 50% BC, and 25% FT 25% S, with 70% humidity, air flow 180 L/h, for 5 days, and 2.48 U/gds for T. indicae-seudaticae at 45°C in medium composed of 50% BC, and 25% FT 25% S, with 70% humidity, air flow 80 L/h, for 2 days. . Enzymes produced, M. anisopliae showed very low transesterification, dismissing the application for obtaining biodiesel, but for T. indicae-seudaticae has shown promise for this application.

Keywords: *Lipase, Metarhizium anisopliae, Thermomucor indicae-seudaticae e solid state fermentation (SSF).*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS	03
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
3.1 Lipases	04
3.2 <i>Metarhizium anisopliae</i>	12
3.3 <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i>	13
3.4 Fermentação em Estado Sólido (FES)	14
3.5 Biorreatores	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Materiais	20
4.1.1 Microrganismos utilizado no cultivo	20
4.1.2 Meio de cultivo	21
4.1.3 Solução nutriente	21
4.1.4 Biorreator de bancada em leito fixo	22
4.2 Métodos Experimentais	22
4.2.1 Fermentação em Sacos de Polipropileno	22
4.2.1.1 Pré-inóculo	22
4.2.1.2 <i>Metarhizium anisopliae</i> ICB 421.....	24
4.2.1.3 <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	25
4.2.2 Fermentação no Biorreator	26
4.2.3 Análise da atividade lipolítica por hidrólise de substrato cromogênico .	27
4.2.4 Reação de Transesterificação	28
4.2.5 Análise dos ésteres por Cromatografia Gasosa (CG)	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1 Fermentação em Sacos Plásticos	30
5.1.1 <i>Metarhizium anisopliae</i> ICB 421	30
5.1.2 <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	33
5.2 Fermentação em Biorreator	36
5.2.1 <i>Metarhizium anisopliae</i> ICB 421	36
5.2.2 <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	41
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	44
6.1 Conclusões	44
6.2 Sugestões para trabalhos futuros	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA FIGURAS

Figura 3.1: Rotas de conversão de biomassa a biocombustíveis (Extraído e modificado de Agarwal, 2007)	09
Figura 3.2: Evolução de publicações e patentes sobre biodiesel (Extraído e modificado de Quintella et al., 2009)	10
Figura 3.3: Artigos publicados e patentes sobre Biodiesel e Biodiesel e Enzimas, indexados pela base de dados ISI- Web of Knowledge	11
Figura 3.4: Reação de transesterificação (Extraída e modificada Marchetti et al., 2007)	12
Figura 3.5: Distribuição longitudinal de umidade e de atividade enzimática para fermentação a 45°C, 75% de umidade inicial a diferentes vazões de ar para 96h de fermentação, onde o meio foi dividido em 10 amostras, sendo 1 o módulo onde há entrada do ar e 10 o módulo de saída. (a- Umidade; b- Atividade enzimática) (Extraído de Zanelato, 2011)	18
Figura 4.1: Diagrama geral do aparato experimental.....	23
Figura 4.2: Biorreator de vidro de bancada utilizado na FES (a – Diagrama Esquemático, b – Vista Lateral)	23
Figura 4.3: Biorreator de aço inox de bancada utilizado na FES (a - Diagrama Esquemático, b – Vista Lateral)	24
Figura 5.1: Atividade lipolítica de <i>M. anisopliae</i> em função do tempo à 28°C com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S e umidade 70%	33
Figura 5.2: Atividade lipolítica de <i>T. indicae-seudaticae</i> N31 em função do tempo à 45°C, com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S e umidade 70%	34
Figura 5.3: Esquema dos pontos de amostragem no reator de vidro	37
Figura 5.4: Atividade da lipase produzida pelo fungo <i>M.anisopliae</i> ICB 421 em biorreator, com variação da umidade inicial do meio e vazão de ar 80L/h, à 28°C, com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S	38
Figura 5.5: Atividade da lipase produzida pelo fungo <i>M.anisopliae</i> ICB 421, em biorreator, com variação da umidade do meio e vazão de ar 180L/h, à 28°C, com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S	39
Figura 5.6: Distribuição da atividade enzimática e umidade do meio após ensaios com umidade inicial de em (a) 70% e (b) 80%	40
Figura 5.7: Atividade da lipase produzida pelo fungo <i>T. indicae-seudaticae</i> N31, em biorreator, com variação da umidade do meio e vazão de ar 80L/h à 45°C, com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S	42
Figura 5.8: Atividade da lipase produzida pelo fungo <i>T. indicae-seudaticae</i> N31, em biorreator, com variação da umidade do meio e vazão de ar 180L/h à 28°C, com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S	42

LISTA TABELAS

Quadro 3.1: Lipases comercialmente disponíveis de origem microbiana produzidas por diferentes companhias (Extraído e modificado de Salihu et al., 2012)	07
Tabela 3.1: Enzimas produzidas em FES utilizando biomateriais como substratos das FES.....	16
Tabela 5.1: Atividade lipolítica <i>M. anisopliae</i> ICB 421 com variação da temperatura, à umidade 70% e meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S	31
Tabela 5.2: Atividade lipolítica <i>M. anisopliae</i> ICB 421 para avaliação da redução do volume de suporte (BC) e aumento volume dos indutores, à 28°C e 70% umidade	32
Tabela 5.3: Atividade lipolítica <i>M. anisopliae</i> ICB 421 com variação da umidade inicial, com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S e à 28°C	32
Tabela 5.4: Atividade da lipase produzida por <i>M. anisopliae</i> ICB 421 em função da variação da umidade inicial do meio e da vazão no biorreator de vidro, à 28°C, com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ae	Atividade enzimática
Ae _{max}	Atividade enzimática máxima
AGL	ácidos graxos livres
BDA	batata dextrose ágar
BC	bagaço de cana
Bu	base úmida
CG	cromatografia gasosa
CG-FID	cromatografia gasosa com detector de ionização de chama
°C	grau Celsius
esporos/mL	unidades esporos por mililitro
FES	fermentação em estado sólido
FSm	fermentação submersa
FT	farelo de trigo
G	força gravitacional
Hz	potência máxima (w)
L/h	litros por hora
Lpm	litros por minuto
Nm	comprimento de onda do espectro visível
NR	Norma Regulamentadora
mL	mililitro
mL/g	mililitro por grama
PNPB	Programa Nacional de produção e uso de biodiesel
RPM	revoluções por minuto
S	soja
TAG	triacilglicerol
Tween	polyoxyethylene sorbitan monolaurate
Ui	umidade inicial
U/gss	unidades por grama de sólidos secos
U/mL	unidades por mililitro
U/L	unidades por litro
µL	microlitros
µM	Milimolar
Mmol	Micromol

1. INTRODUÇÃO

Segundo Salihu et al. (2012), *“a bioconversão de resíduos agrícolas para produção de enzimas ou outros produtos de maior valor agregado, ocupará posição de destaque no futuro da biotecnologia, principalmente por apresentar o conceito de sustentabilidade e por sua flexibilidade, alcançando tanto os países desenvolvidos quanto aqueles em desenvolvimento”*. As enzimas podem ser empregadas nos mais diversos tipos de processos industriais, sendo as principais vantagens dos processos enzimáticos a sua especificidade, condições brandas para operação e redução da produção de resíduos, que resultam em menores custos de construção e operação das plantas, menor gasto energético e menor custo de tratamento resíduos. (HASAN, et al. 2006).

Enzimas de origem microbiana são mais utilizadas que aquelas provenientes das plantas e dos animais devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, à maior produtividade, à facilidade de manipulação genética e à oferta regular, em decorrência da ausência de flutuações sazonais e do crescimento rápido dos microrganismos. Além, de serem mais estáveis que suas correspondentes obtidas de fontes animais e vegetais, a produção de enzimas microbianas é mais prática e segura. Porém, até 2006 apenas 2% dos microrganismos do mundo haviam sido testados como fontes de enzimas (HASAN, et al. 2006).

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) são importantes enzimas industriais e, devido à sua versatilidade, estão presentes em diferentes processos. O crescente interesse na produção de lipases está associado a aplicações como aditivo alimentar (alteração de sabor), na química fina (síntese de ésteres), em detergentes (hidrólise de gorduras), no tratamento de águas residuais (decomposição e remoção de substâncias oleosas), em cosméticos (remoção de lipídios), em produtos farmacêuticos (digestão de óleos e gorduras de alimentos), no processamento de couro (remoção de lipídios das peles de animais) e em ensaios biomédicos (triglicerídeos no sangue). Além disso, as lipases têm uma aplicação importante no campo da bioenergia, especialmente na produção de biodiesel, um setor em expansão, como resultado da crescente procura mundial por energia renovável (SALIHU et al. 2012).

O engenheiro mecânico alemão Rudolf Diesel, inventor do motor a diesel, disse em um discurso em 1912 que: *“O uso de óleos vegetais como combustível pode parecer insignificante hoje em dia. Mas com o tempo, irá se tornar tão importante quanto o petróleo e o carvão o são atualmente”* (KNOTHE et al, 2005).

Um século após esta afirmação, o cenário energético tem despertado um contínuo interesse de investigação para obtenção de combustíveis não derivados do petróleo, renováveis e não poluentes. As reservas mundiais de energia primária e matérias-primas são limitadas; segundo estimativas de 2007, as reservas de carvão são suficientes para atender a demanda de 211 anos, as de gás natural de 56 anos e as de petróleo de 34 anos (AGARWAL, 2007). Devido aos crescentes custos de exploração dos combustíveis fósseis e à limitação de emissão de poluentes imposta por tratados internacionais, as buscas por combustíveis alternativos, acentuaram-se.

Uma alternativa ao alto custo das lipases comerciais é a identificação de microrganismos produtores de lipases em níveis e quantidades suficientes para viabilizar seu cultivo e produção. Recentemente, Ferrarezi (2011) demonstrou que o fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 produziu satisfatoriamente lipases em fermentação em estado sólido (FES), sendo uma opção interessante para possível aplicação industrial. Por outro lado, fungos entomopatogênicos, tais como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, necessitam secretar lipases para poderem atacar o exoesqueleto dos insetos hospedeiros (MEYLING, EILENBERG, 2007), tornando-se assim uma alternativa a ser avaliada.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo principal a produção de enzimas lipolíticas por FES em um biorreator de leito fixo, em escala de bancada, em quantidades passíveis de despertar o interesse para aplicações industriais.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi de produzir lípases por fermentação em estado sólido empregando-se os fungos mesofílico *Metarhizium anisopliae* ICB 421 e termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em escala de sacos de polipropileno e em biorreator de bancada de leito fixo.

Os objetivos específicos foram:

- Realizar experimentos em sacos de polipropileno, tendo como variáveis a composição do meio de cultivo, a umidade do substrato e a temperatura, de modo a obter a condição ótima de fermentação;
- Realizar fermentações em biorreator de bancada de leito fixo na melhor condição observada na escala de sacos de polipropileno, tendo como variáveis a umidade do meio, a temperatura e a vazão de ar, avaliando-se ao final dos experimentos as distribuições longitudinais de umidade e de atividade enzimática;
- Comparar as quantidades de enzima produzida em ambas as escalas de processo e entre ambos os microrganismos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Lipases

Lipases (EC 3.1.1.3, hidrolase do éster de glicerol, ou triacilglicerol acilhidrolase) são uma classe de enzimas de considerável relevância fisiológica e grande uso industrial, que catalisam a hidrólise, a esterificação (síntese), e a transesterificação (troca do grupo de ésteres). São utilizadas em diversos processos, tais como a hidrólise de gorduras, o desenvolvimento de aromas em produtos lácteos, a síntese de ésteres, a transesterificação de óleos e gorduras, a produção de compostos orgânicos quirais, de produtos de limpeza e de tratamento resíduos domésticos e industriais (SHARMA et al., 2001; SAXENA et al., 2003).

Sharma et al. (2001) já apontavam a perspectiva de que as lipases seriam no futuro, tão importante industrialmente como são as proteases e as carboxilases e as hidrolases. Marchetti et al. (2007) relatam a relevância que as lipases adquiriram, quando passaram a ser empregadas largamente como catalisadoras para reações de esterificação e transesterificação, responsáveis pela produção de biodiesel.

A maior aplicação comercial de lipases se encontra na indústria química, para fabricação de detergentes em pó, representando aproximadamente 32% do total do volume de lipases vendidas no mundo. Para serem utilizadas em detergentes, estas lipases necessitam ser termoestáveis e permanecerem ativas em ambientes alcalinos, típicos de máquinas de lavar. Anualmente estima-se que 1000 toneladas de lipases são adicionadas a aproximadamente 13 bilhões de toneladas de detergente (SHARMA et al., 2001).

HASAN et al. (2006) afirmaram que as lipases podem ser utilizadas em diversos processos, entre eles:

- ✓ Produção de polímeros biodegradáveis: aplicações na síntese orgânica para produção de compostos biodegradáveis;
- ✓ Na indústria têxtil: auxiliando na remoção de lubrificantes, de modo a proporcionar um tecido com maior capacidade de absorção do tingimento e redução da incidência de estrias e rachaduras por abrasão nos tecidos;

- ✓ Na indústria de detergentes: permite que se utilize temperatura mais branda na lavagem, gerando ganho energético e ambiental, pois diminui a quantidade produzida de resíduo e sua toxicidade;
- ✓ Na indústria de alimentos em geral: adicionada aos alimentos para modificar o sabor, atuando na síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e de álcoois, que são conhecidos compostos que conferem sabor e odor;
- ✓ Como ferramenta de diagnóstico médico: são importante como alvos terapêuticos ou marcadores enzimáticos no setor médico. Podem ser utilizadas como ferramentas de diagnóstico e sua presença, ou o aumento de seus níveis, pode indicar infecção ou determinada doença;
- ✓ Na indústria de laticínios: são amplamente utilizadas na hidrólise de gordura do leite para realçar o sabor e acelerar a maturação dos queijos, no auxílio à fabricação de bases de queijos e na lipólise de manteiga e creme de leite;
- ✓ Aplicação médica: podem ser utilizadas como auxiliares digestivos, agentes terapêuticos no tratamento de distúrbios gastrointestinais e manifestações de alergia digestiva;
- ✓ Como biossensores: baseado na dissolução enzimática catalisada de um filme de polímeros biodegradáveis;
- ✓ Na indústria de couros: representam um método mais ecológico de remoção de gordura de couros bovinos, permitindo a completa substituição de tensoativos e solventes;
- ✓ Tratamento de resíduos e tratamento esgotos: são utilizadas em lodo ativado e outros processos aeróbios de tratamento de resíduos, em que as camadas finas de gordura tem de ser continuamente removidas da superfície dos tanques aerados para permitir o transporte de oxigênio, e na degradação de detritos orgânicos, na limpeza de tanques de retenção, fossas sépticas e caixas de gordura;
- ✓ Na Indústria de papel e celulose: utilizadas em larga escala desde o início de 1990, sua aplicação aumenta a taxa de produção de pasta de celulose, diminui o uso de produtos químicos, prolonga a vida útil dos equipamentos, reduz o nível de poluição das águas residuais, economiza energia e tempo, e reduz o custo de produção;

- ✓ Na produção de biodiesel: é uma via de condições de processamento mais brandas para a produção de biodiesel, gerando menos poluentes do que a via catalítica química.

Lipases são produzidas por microrganismos (bactérias e fungos), animais e vegetais, embora os preparados comerciais sejam principalmente de origem microbiana, pois possuem baixos custos de produção e por suas propriedades serem de fácil modificação, através de manipulação genética dos microrganismos produtores. As lipases microbianas podem ser de origem extracelular e intracelular e ambas podem ser utilizadas para a síntese de biodiesel, mas a maioria das pesquisas tem sido conduzidas através do emprego de preparações comerciais das lipases extracelulares (ANTCZAK et al., 2009).

Silva et al. (2009) informam que número de lipases disponíveis tem aumentado consideravelmente na última década, estimulado pelo aumento da demanda por estes biocatalizadores, o que tem também fomentado o aumento dos estudos sobre produção de lipases microbianas e sobre a caracterização de novas enzimas lipolíticas, além do desenvolvimento de novos processos de purificação. A maioria das lipases usadas nas indústrias é de origem microbiana, obtidas a partir de diferentes espécies de fungos e bactérias. O Quadro 3.1 resume os principais microrganismos e empresas produtoras de lipases para aplicação comercial.

Um grande número de fungos filamentosos tem sido estudado para a produção de lipases, pois as enzimas produzidas por fungos são normalmente extracelulares, o que facilita a extração da enzima do meio de fermentação (BEYS SILVA et al., 2005).

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza, desenvolvem-se numa grande variedade de habitat, incluindo ambientes extremos. Fungos mesofílicos possuem temperatura ótima de multiplicação entre 25°C e 40°C, com mínima e máxima entre 5°C e 50°C, respectivamente. Entre os mesofílicos para produção de lipases destacam-se os fungos entomopatogênicos, que parasitam insetos, matando-os ou incapacitando-os, secretando lipase para atacar o exoesqueleto dos hospedeiros e possibilitando a invasão. Pela necessidade de excretar lipase para a

Quadro 3.1: Lipases comercialmente disponíveis de origem microbiana produzidas por diferentes companhias (Extraído e modificado de Salihu et al., 2012).

ORIGEM	NOME COMERCIAL	FORNECEDOR	APLICAÇÕES	INDÚSTRIA
Bactéria				
<i>Alcaligenes sp.</i>	Lipase PL	Meito Sangyo, Co.	Modificação de óleos e gorduras / aditivos para alimentos	Processamento de alimentos
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Lipase CV	Genzyme	Diagnóstico / Análise	Saúde e Diagnóstico
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipase SL	Amano	Síntese quirál	Processamento de alimentos
<i>Pseudomonas menodocina</i>	Lumafast	Genencor International	Hidrólise de óleos e gorduras	Detergente
Fungos				
<i>Aspergillus niger</i>	Lipase DS	Amano	Suplemento alimentar	Biofarmacêutica
	Lipase	Sigma	Síntese orgânica / Análise	Processamento de alimentos
<i>Rhizopus oryzae</i>	Lipopan [®] F ^a	Novozyme	Fortalecimento massa de pão	Panificação
	Lipomod [™] 627P-L627P	Biocatalysts	Textura da massa de pão / vida de prateleira	Panificação
	Lipomod [™] 36P-L036P		Dietética	Biofarmacêutica
<i>Rhizomucor miehei</i>	Palatase ^{®a}	Novozyme	Realce de sabor queijo	Laticínio
Leveduras				
<i>Candida cylindracea</i>	Lipase MY	Meito Sangyo, Co.	Dietética	Biofarmacêutica
	Resinase ^{®a}	Novozyme	Controle alcatrão de carvalho	Produtos florestais
<i>Candida antarctica</i>	Novozym [®] 435 ^a	Novozyme	Especialidades à base de óleo	Processamento de alimentos
	Noopazyme ^{®a}		Massas / macarrão	Alimentos à base de cereais
<i>Candida cylindracea/porcine</i>	Lipomod [™] 29P-L029P	Biocatalysts Ltd.	Sabor tipo Cheddar	Laticínios

invasão do hospedeiro, fungos entomopatogênicos representam importante via de interesse para a produção industrial de lipases (GOMES et al., 2007).

Metarhizium anisopliae é um fungo entomopatogênico produzido comercialmente, sendo amplamente distribuído na natureza como parasita de mais de 200 espécies de insetos. É empregado com sucesso no controle biológico de pragas que atacam principalmente as lavouras de cana-de-açúcar, com destaque especial para a cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva frimbriolata*, e a cigarrinha-da-folha, *Mahanarva posticata*. (ALVES, 1998; TAVASSOLI et al., 2012).

Outro grupo de interesse são os fungos termofílicos, que possuem temperatura ótima de multiplicação entre 45°C e 65°C, com mínima e máxima entre 35°C e 90°C, respectivamente. Normalmente, desenvolvem-se em processo de compostagem durante a fase de alta temperatura (acima de 40°C), sucedendo a microflora mesofílica, que consome as fontes de carbono prontamente assimiláveis e solúveis (açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos) ou polímeros de acesso mais fácil, gerando calor metabólico. Com o aumento de temperatura, os microrganismos termofílicos se desenvolvem, porém, não encontram fontes de carbono facilmente acessíveis, restando compostos cuja degradação requer intensa liberação de enzimas extracelulares. Por isso, espera-se que fungos termófilos sejam potenciais produtores de lipases em meios ricos em ácidos graxos (GOMES et al., 2007).

Espera-se que enzimas extracelulares produzidas por microrganismos termófilos, sejam capazes de catalisar reações que ocorram em temperaturas iguais ou superiores à de seu cultivo, ou seja, acima de 45°C. Tal termotolerância é interessante do ponto de vista industrial, pois permite maior flexibilidade aos processos que empregam biocatalisadores. Umsza-Guez (2009) utilizou o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, para produzir pectinases por FES em biorreator de leito fixo, e concluiu que este fungo produz satisfatoriamente não somente exo-PG e endo-PG, mas outras enzimas de interesse comercial, tais como celulasas, xilanases, avicelases, amilases, manganês peroxidases e lignina peroxidases. Posteriormente, Mehreb (2010) constatou que este fungo também produz proteases em grandes quantidades por FES.

Ferrarezi (2011) testou linhagens termofílicas *Thermomyces lanuginosus* Rob., *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756, *Rhizomucor pusillus*, *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, *Myceliophthora* sp F2.1.4, *Myceliophthora* sp F2.1.3, *Myceliophthora* sp F2.1.1, *Thermomyces lanuginosus* TO-03, *Thermomyces lanuginosus* TO-05 e *Thermomyces lanuginosus* Rob. As cepas de *T. indicae-seudaticae* N31 e *Rhizomucor pusillus* foram escolhidas para a continuidade dos estudos, por serem as melhores produtoras de lipases em FES.

Uma aplicação para as lipases que tem recebido bastante atenção da literatura é para a produção de biodiesel. O termo biocombustível se refere a combustíveis, sólidos (carvão biológico), líquidos (óleo vegetal, bioetanol e biodiesel) ou gasosos (biogás, gás natural e biohidrogênio) produzidos a partir de biomassa (DEMIRBAS, 2009). Essa grande variedade de combustíveis produzidos a partir de materiais de origem biológica e a descrição de suas rotas de conversão, foram sistematizadas por Argawal (2006) e é apresentada pela Figura 3.1.

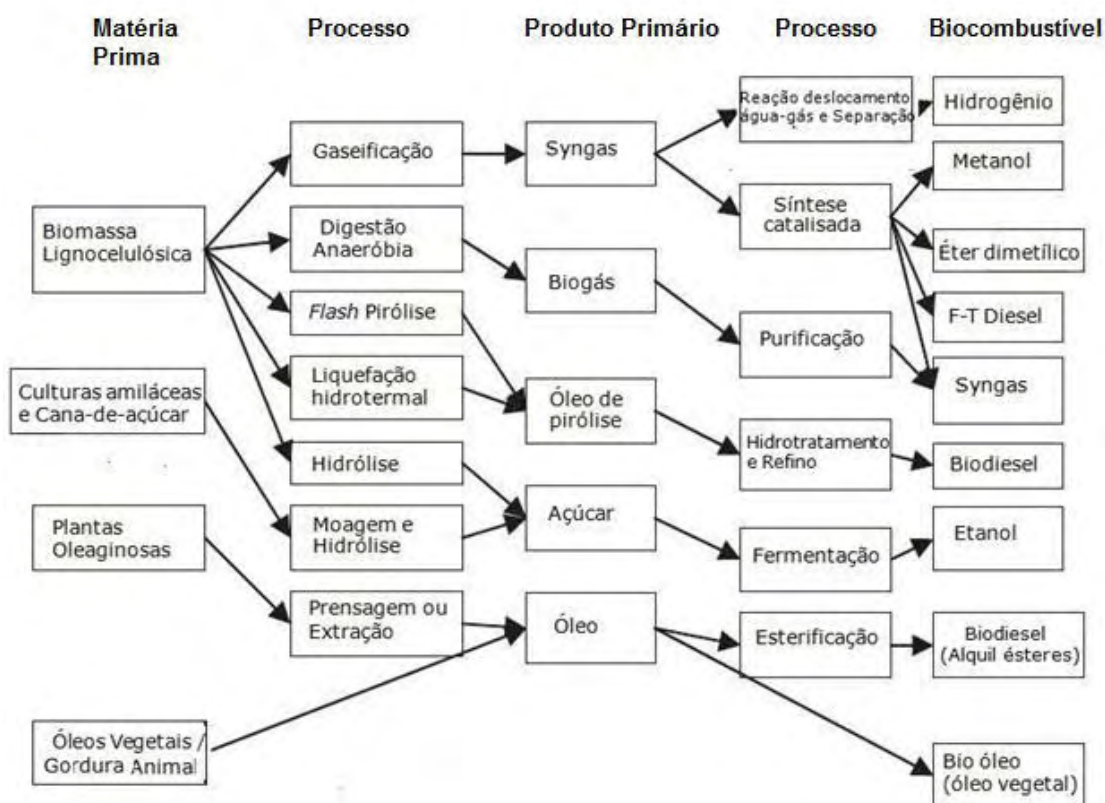


Figura 3.1: Rotas de conversão de biomassa a biocombustíveis (Extraído e modificado de Agarwal, 2007)

Biodiesel, segundo Agarwal (2006), é o nome dado ao combustível monoalquil à base de éster de queima limpa, feito de materiais naturais, de fontes renováveis. É um combustível mais oxigenado do que o óleo diesel, razão pela qual possui a combustão mais completa, e gera menos formação e emissão de partículas poluentes. O biodiesel é compatível com o óleo diesel e pode ser misturado em qualquer proporção para criar uma mistura estável, podendo ser usado em motores sem modificações significativas.

Quintella et al. (2009) ilustram o crescente interesse pelo biodiesel através das evoluções anuais de artigos e patentes, como mostra a Figura 3.2, mostrando ser uma área competitiva em termos de pesquisa científica e tecnológica. A Figura 3.3 mostra a evolução das pesquisas e patentes compiladas através da base de dados *ISI-Web of Knowledge*, onde se observa que o número de publicações e patentes que empregam enzimas na produção de biodiesel ainda é pequeno, havendo espaço considerável para pesquisas na área.

De acordo com Vacatto et al. (2010), a partir de 2005, com o início do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), a produção de biodiesel passa ser tema estratégico, com estímulo à tecnologia e pesquisa de inovação, com o objetivo de introduzir de forma sustentável o uso desta fonte de energia renovável na matriz energética do Brasil.

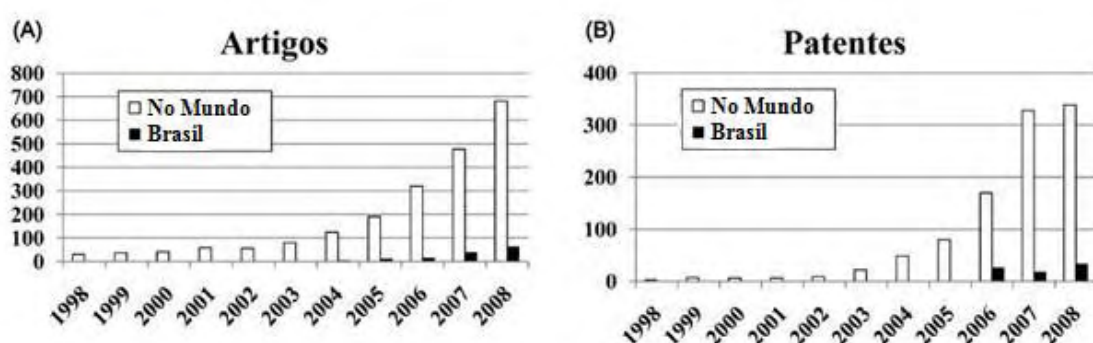


Figura 3.2: Evolução de publicações e patentes sobre biodiesel
(Extraído e modificado de Quintella et al., 2009)

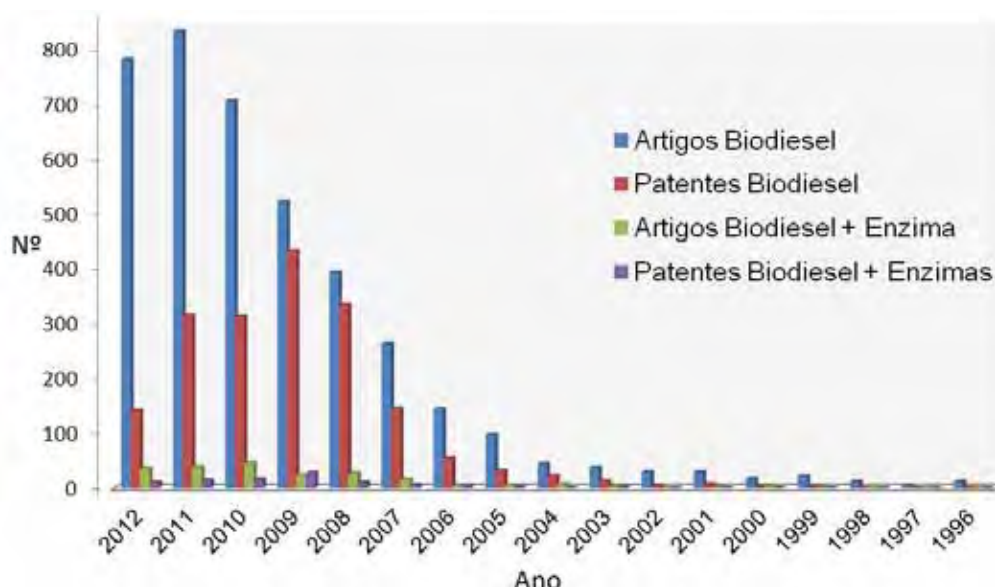


Figura 3.3: Artigos publicados e patentes sobre Biodiesel e Biodiesel e Enzimas, indexados pela base de dados ISI- Web of Knowledge.

Dentre as alternativas para converter o óleo vegetal a biodiesel, a transesterificação tem sido a preferida pelos pesquisadores. Transesterificação é a transformação de um éster carboxílico em outro, através da troca do grupo funcional RO- presente no éster original, por outro grupo semelhante proveniente de um álcool, na presença de um catalisador ou não, para dar origem à glicerina e a mono-alkil ésteres (biodiesel), como mostra a Figura 3.4 (DABDOUB et al., 2009).

Tradicionalmente, o biodiesel é produzido através das reações de transesterificação de diferentes tipos de triglicerídeos (óleo/gorduras) reagindo diretamente com um álcool de cadeia curta, geralmente metanol ou etanol, para produzir ésteres e glicerina. Para tornar isso possível, um catalisador é adicionado à reação (MARCHETTI et al., 2007; DABDOUB et al., 2009).

Na produção industrial de biodiesel, os catalisadores químicos utilizados na transesterificação (geralmente uma base forte) fornecem rendimento da reação de transesterificação perto de 99%. Porém a produção global de biodiesel é relativamente limitada, pois os catalisadores básicos tradicionais requerem óleo com elevada pureza, praticamente isentos de AGL, fosfatídeos e água, além da dificuldade de recuperação da glicerina pura, a formação de sabões, mono e diacilgliceróis e pigmentos (ANTCZAK et al., 2009).

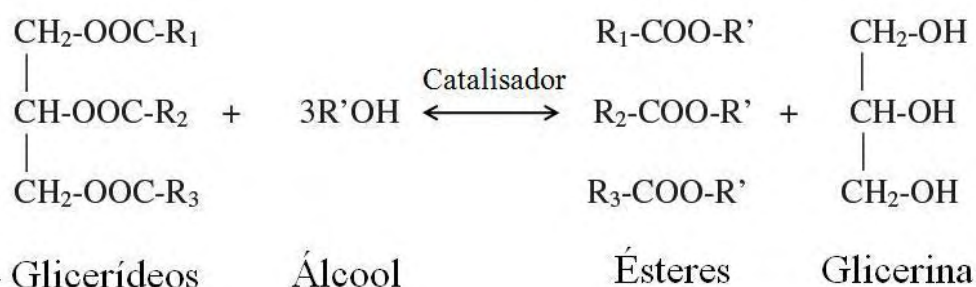


Figura 3.4: Reação de transesterificação (Extraída e modificada Marchetti et al., 2007)

3.2 *Metarhizium anisopliae*

Por ser utilizado amplamente em programas de controle de pragas, *Metarhizium anisopliae*, juntamente com outro ascomiceto, *Beauveria bassiana*, são os fungos entomopatogênicos melhores caracterizados. *M. anisopliae* é facilmente encontrado na natureza, no solo, na rizosfera de plantas ou nos cadáveres de artrópodes como saprófitas e como parasitas de uma ampla variedade de insetos e carrapatos (BEYS DA SILVA et al., 2010 ; SCHRANK, VAINSTEN, 2010).

O processo da destruição das pragas envolve a adesão do esporos do fungo à superfície do inseto, sendo complementada pelas fases de germinação, diferenciação, penetração e invasão da cutícula do inseto através do crescimento das hifas. Essa penetração ocorre devido à pressão mecânica das hifas e envolvem processos de digestão enzimática de proteínas, quitinas e lipídeos, o que indica a viabilidade da produção de amilases, proteases, lipases e quitinases por *M. anisopliae*, pois são peças fundamentais do mecanismo de invasão do fungo (ALVES, 1998).

A adesão é fundamental para o início da infecção, pois envolve interações hidrofóbicas entre as proteínas da superfície dos esporos e da camada lipídica que cobre a cutícula de artrópodes. A degradação dos lipídios é relacionada com a penetração e pré-crescimento de *M. anisopliae* na cutícula do hospedeiro. As moléculas de lipídios estão presentes na epicutícula, a primeira barreira contra ataque de microrganismos patogênicos dos artrópodes, reforçando a importância da presença de enzimas lipolíticas em diferentes estágios da infecção inicial, para que

a mesma seja efetiva. Por isso, além das lipases identificadas na superfície dos conídios, *M. anisopliae* produz lipases como parte do processo de infecção. O que se tem é que a degradação da camada lipídica do hospedeiro pode ser importante para o reconhecimento de um hospedeiro suscetível, assim como para iniciar produção de moléculas nutrientes servindo de apoio ao início da germinação do esporo (SCHRANK, VAINSTEN, 2010).

Silva et al. (2009) realizaram o cultivo do fungo *M. anisopliae* para a produção de lipase por FES. Para tanto, utilizaram arroz, acrescidos de solução de peptona. O fungo foi cultivado a 28°C, durante 14 dias, após o que os conídios foram removidos e a atividade enzimática avaliada, resultando em 25 U/gss (gramas de sólido seco). Foi comprovada a presença de lipase no micélio fúngico e nos esporos, sendo que a enzima mostrou-se muito hidrofóbica, interagindo fortemente com a resinas utilizadas em processos de purificação.

Prakash et al. (2008) realizaram ensaios para produção de esporos de *M. anisopliae*, onde o substrato, composto de arroz, sorgo e cevada, foi incubado a 26 °C por 15 dias. As condições ideais de umidade e pH para o cultivo em arroz foram 22% e 7,0, respectivamente; para sorgo 75% e 7,0 e para cevada 73% e 6,7.

3.3 *Thermomucor indicae-seudaticae*

Umsza-Guez (2009) utilizou o fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em seus experimentos para produção de pectinase em reator de leito fixo por FES, descrevendo-o como colônia cotonosa marrom-acinzentada com crescimento e esporulação muito rápida no substrato, menos de 24 horas, tanto em meio gelatinoso como na FES, aliada à boa produção enzimática. Além de bom produtor de pectinase, *T. indicae-seudaticae* também produziu outras enzimas despolimerizantes em quantidades significativas. As condições ideais para produção das enzimas pectinolíticas foram tempo de cultivo de 24 horas, 45°C e 70% (b.u.) de umidade do substrato.

Ferrarezi (2011) utilizou *T. indicae-seudaticae* N31 para produção de lipases e desenvolveu condições de cultivo que elevaram a produção de enzima em até 36

vezes, destacando entre elas, a ausência de glicose, o uso de cloreto de amônio e o uso óleo de soja como fontes suplementares de nutrientes. As condições ideais para a produção de lipase foram 24 horas de fermentação, com concentração de esporos 5×10^5 esporos/mL e temperatura de 45°C, em um meio composto por 100% de bagaço de cana enriquecido com óleo de soja, obtendo atividade enzimática igual a 16,78 U/gss.

3.4 Fermentação em Estado Sólido (FES)

Fermentação em estado sólido (FES) é definida como a técnica de fermentação envolvendo sólidos na ausência ou quase ausência de água livre, utilizando um substrato natural, ou um substrato inerte usado como suporte. O substrato deve possuir umidade suficiente para sustentar o crescimento e o metabolismo do microrganismo (SINGHANIA et al., 2009; PANDEY, 2003; PANDEY et al., 2000).

Soccol e Vandenberghe (2003) e Prakash et al. (2008) apontam que as técnicas de FES são de grande interesse para o Brasil, pois possibilitam uma gestão sustentável dos resíduos agroindustriais, agregando valor econômico a estes, além de evitar a geração de problemas ambientais.

Existem vários fatores importantes, que afetam os processos FES. Entre eles destacam-se: a seleção de uma cepa adequada de microrganismo, a seleção do substrato adequado para seu cultivo e a seleção dos parâmetros de processo, físicos, químicos, bioquímicos e de engenharia. A grande maioria dos estudos para obtenção dos mais diversos produtos por FES exploram fungos filamentosos e leveduras, sendo as tentativas de utilização de cepas bacterianas pouco representativas (PANDEY et al., 2000).

A seleção de um substrato para o processo FES depende de vários fatores, principalmente relacionados com o custo e disponibilidade deste material. No processo FES, o substrato sólido não só fornece os nutrientes para o crescimento microbiano, mas também serve como suporte para fixação das células. Em alguns casos, o material sólido serve apenas de suporte a um substrato líquido e de

estrutura de sustentação para o crescimento microbiano (PANDEY et al., 2000; UMSZA GUEZ, 2009).

A granulometria e o nível de umidade são fatores críticos na escolha de um determinado substrato. Pequenas partículas, geralmente, proporcionam maior área superficial que favorecem o ataque microbiano e são, portanto, consideradas como característica desejável. No entanto, partículas muito pequenas podem resultar em aglomeração, o que pode interferir negativamente por diminuir a aeração/respiração microbiana (SINGHANIA et al., 2009; PANDEY et al., 2000).

Um grande número de microrganismos está sendo cultivado para a produção de várias enzimas por FES e resíduos agroindustriais estão sendo utilizados como substrato, como pode ser visto pela Tabela 3.1.

Além da possibilidade de empregar substratos de baixo valor, a FES é mais vantajosa do que a fermentação submersa (FSm) por resultar numa maior concentração de enzima (SOCCOL et al., 2003). Uma das prováveis razões para esse maior rendimento é que na FES as culturas microbianas são cultivadas em condições mais próximas ao seu habitat natural, adaptando-se melhor às condições da fermentação (PANDEY, 2003). No entanto, uma característica negativa da FES é a heterogeneidade da produção, tanto no tempo quanto no espaço, tornando necessárias etapas posteriores de padronização do produto (ZANELATO, 2011). Outro aspecto negativo da FES é a dissipação deficiente de calor, podendo comprometer a produção de metabólitos e a própria sobrevivência do microrganismo (SINGHANIA et al., 2009). Esta baixa dissipação de calor está correlacionada à baixa condutividade térmica molecular dos materiais sólidos e às reduzidas vazões de ar empregadas nos biorreatores de FES.

3.5 Biorreatores para FES

O projeto ideal de um biorreator para FES deve buscar soluções para superar os problemas dos efeitos da transferência de calor e massa e possibilitar fácil adaptação do microrganismo. Os fermentadores do tipo bandeja são os mais utilizados no oriente para a produção de alimentos e, portanto, são os mais

Tabela 3.1. Enzimas produzidas em FES utilizando biomateriais como substratos das FES.

Autor	Microorganismo	Enzimas	Meio	Atividade enzimática
Couri <i>et al.</i> , (2000)	<i>A. niger</i> 3T5B8	Xilanase	Casca de manga e farelo de trigo	30,6 U/mL
		Poligalacturonase		30,7 U/mL
		Protease		5,27 U/mL
Beys Silva <i>et al.</i> , (2005)	<i>M. anisopliae</i>	Lipase	-	4,97 U/mL
Martin <i>et al.</i> , (2010)	<i>T. indicae-seudaticae</i> N31	Pectinase	Farelo de trigo e bagaço de laranja	120 U/mL
Merheb-Dini <i>et al.</i> , (2010)	<i>T. indicae-seudaticae</i> N31	Protease	-	160 U/mL
Silva <i>et al.</i> , (2011)	<i>Penicillium brevicompactum</i>	Lipase	Torta babassu e farinha de mamona	244 U/gss
Deive <i>et al.</i> , (2009)	<i>T. thermophilus</i> HB27	Lipase	-	409 U/L
Jain (1995)	<i>Melanocarpus albomyces</i> II-68	Xilanase	Farelo de arroz	1084 U/gss
Bahkali (1995)	<i>Verticillium tricornus</i>	CMCase		25 U/mL
Iffikhar <i>et al.</i> , (2010)	<i>Rhizopus Oligosporus</i>	Lipase	-	42 U/mL
Botella <i>et al.</i> , (2007)	<i>A. Awamori</i>	Xilanase	Resíduos de uva	38U/gss
Badhan <i>et al.</i> , (2007)	<i>Myceliophthora</i> sp. IMI 387099	Xilanase	Palha de arroz e trigo, farelo de trigo, derivado de milho	entre 128, 9 e 900,2 U/g
		CMCase		entre 6,62 e 32,9 U/g
		β- glicosidase		entre 2,01 e 7,48 U/g

estudados. Contudo, nos últimos anos, tem-se dado atenção ao desenvolvimento de fermentadores de leite empacotado, que apresentam baixo custo de confecção, baixa manutenção, espaço reduzido e grande facilidade de manuseio (SINGHANIA et al., 2009).

Os estudos exploratórios iniciais em FES são realizados em sacos de polipropileno ou frascos Erlenmeyer, sem aeração. Nestes estudos, precisa-se ajustar as condições de umidade, composição do substrato e temperatura, ideais ao cultivo do microrganismo e à produção do produto desejado (UMSZA-GUEZ, 2009; FERRAREZI, 2011; ZANELATO, 2011).

A transposição da escala de frascos para a de biorreatores faz-se em pequenas colunas de vidro ou de metal inoxidável, nas quais se injeta ar a baixas velocidades, mantendo-se as condições ótimas de cultivo obtidas em sacos plásticos ou frascos de vidro. Nestes ensaios, é possível avaliar a distribuição longitudinal de temperatura durante os experimentos e de umidade e atividade enzimática ao final dos ensaios. Umsza-Guez (2009) observou um perfil de umidade do meio poroso, crescente da base para o topo do fermentador de leite empacotado, após 24h de fermentação. Tal segregação teve forte impacto negativo sobre a atividade enzimática, que teve queda nas regiões mais secas do leite (base) e nas mais úmidas (topo), apresentando maiores valores nas porções intermediárias do leite. No entanto, Zanelato (2011), constatou uma tendência de queda da atividade enzimática com o aumento do leite, como mostra a Figura 3.6, em seus ensaios após 96h de fermentação, indicando que o excesso de água no meio, bloqueando os poros do meio de cultivo, é mais deletério do que a secagem do leite nas condições adotadas. Umsza-Guez (2009) avaliou a produção de pectinase por FES pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, utilizando para isso meio composto de 40% bagaço de laranja, 40% farelo de trigo e 20% bagaço de cana, à 45°C, 70% de umidade e vazão ar de 120 L/h, por 24 horas. Zanelato (2011) avaliou a produção de enzimas celulolíticas por FES pelo fungo termofílico *Myceliophthora* sp., utilizando como substratos meios compostos por 70% bagaço de cana e 30% farelo de trigo à 50 °C, umidade de 80% e vazão de ar de 80 a 120 L/h, por 96 horas. Ambos os autores obtiveram resultados satisfatórios.

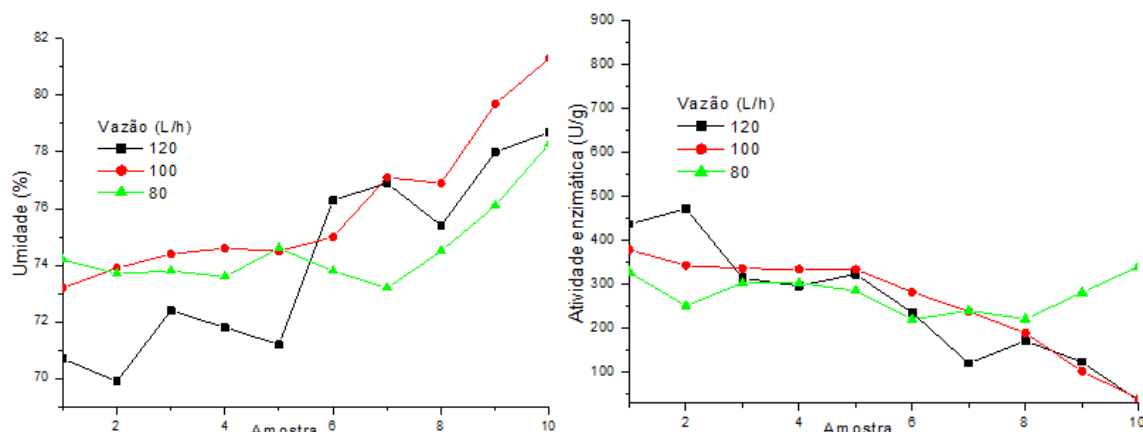


Figura 3.6: Distribuição longitudinal de umidade e de atividade enzimática para fermentação a 45°C, 75% de umidade inicial a diferentes vazões de ar para 96h de fermentação, onde o meio foi dividido em 10 amostras, sendo 1 o módulo onde há entrada do ar e 10 o módulo de saída. (a- Umidade; b- Atividade enzimática) (Extraído de Zanelato, 2011).

Tal segregação de umidade no leito é decorrente da interação entre o ar percolante e o meio poroso. O meio poroso é empacotado no leito a umidades muito acima da umidade de equilíbrio para a temperatura escolhida para o processo, uma vez que a água presente no sistema deve suprir as necessidades metabólicas do microrganismo e servir de veículo para as trocas gasosas e diluição de solutos e metabólitos. O ar é introduzido no sistema com umidades relativas muito próximas à saturação e, em consequência disso, passa a secar as porções inferiores do leito. Ao deixar o reator, o ar está saturado e à temperatura da reação, encontrando o ambiente externo a uma temperatura mais baixa (como nos trabalhos de Umsza-Guez e Zanelato, que cultivaram fungos termofílicos), de modo que o excedente de umidade retorna ao reator, molhando as porções superiores do leito.

Os biorreatores em escala piloto e industrial são encontrados em menor número, pois necessitam atender uma realidade mais complexa que a encontrada na escala laboratorial, pode-se citar entre elas (DURAND, 2002):

- O fato de após certa quantidade crítica de substrato, a remoção de calor torna-se muito difícil e as estratégias de projeto disponíveis se restringem, pois o meio sólido se compacta ou cria-se a canalização do ar, fatores que somados afetam a transferência de calor e massa;

- Sensibilidade/resistência do microrganismo em relação à agitação mecânica, pois quando as hifas são cenocíticas, elas podem se romper devido à agitação mecânica;
- A natureza do substrato e a necessidade de pré-tratamento ou não, os procedimentos adequados para a inoculação, a esterilidade e o nível de contaminação aceitável para o processo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental desenvolvido nesta dissertação foi realizado nos laboratórios do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada (LBPMA), do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Câmpus de São José do Rio Preto da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

4.1 Materiais

4.1.1 Microrganismos utilizados no cultivo

A cultura estoque do fungo *Metarhizium anisopliae* ICB 421, foi conservada em tubos de ensaio com meio de cultura batata-dextrose-agar (BDA), cobertas com óleo mineral, esterilizados e vedados com algodão e filme plástico PVC. A cultura foi repicada a cada dois meses em tubos de ensaio contendo o meio BDA inclinado, com a ajuda de uma alça de platina. Após o repique, os tubos de ensaio contendo os esporos foram incubados em estufa a 28 °C durante 7 dias. Após este período, os tubos foram mantidos sob-refrigeração à 7°C, por no máximo 30 dias.

O fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, foi isolado em trabalhos prévios do grupo de pesquisa em pilhas de bagaço de cana e as matrizes foram mantidas em óleo mineral em freezer a -80°C. As culturas foram repicadas a cada dois meses em tubos de ensaio contendo meio de cultura Sabouraud-dextrose-agar inclinado, com a ajuda de uma alça de platina. Após o repique, os tubos de ensaio contendo os esporos foram incubados em estufa a 45°C durante três dias, após o que, os tubos foram mantidos sob-refrigeração a 7°C, por no máximo 30 dias.

O fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 faz parte da coleção de microrganismos do LBPMA e o fungo *Metarhizium anisopliae* ICB 421 foi gentilmente cedido pelo Instituto Biológico de São Paulo.

4.1.2 Meio de cultivo

Foram utilizados para compor o meio de fermentação bagaço de cana-de-açúcar como suporte, para estruturação do meio, farelo de trigo, como indutor de crescimento do fungo, e grãos de soja moídos, para induzir a produção da enzima.

O bagaço de cana-de-açúcar foi gentilmente cedido pela Usina Vale, de Onda Verde, SP. Para emprego nos experimentos, o bagaço foi lavado em água corrente para retirada da sacarose residual e impurezas, após o que foi seco a 60°C em estufa de convecção forçada até peso constante. O bagaço foi então peneirado com peneira de 3 mm de abertura, para retirada de material mais grosseiro, e na sequência peneirado novamente com peneira de 1,41 mm de abertura, para retirada de poeira e partículas mais finas. O bagaço peneirado foi acondicionado em sacos de polietileno de parede espessa e mantido na câmara de refrigeração até o uso.

O farelo de trigo foi adquirido no comércio local e utilizado nos experimentos sem tratamento prévio. O farelo foi acondicionado em sacos plásticos e mantido em câmara de refrigeração até o uso.

A soja foi adquirida em grãos no comércio local e triturada em processador doméstico, sendo posteriormente acondicionada em sacos plásticos e mantida em câmara de refrigeração até o uso.

4.1.3 Solução nutritiva

Para o cultivo dos fungos utilizou-se a solução nutritiva modificada Ferrarezi (2011) e desenvolvida por Castro-Ochoa et al. (2005) contendo (g.L⁻¹): 1,0 peptona; 10,0 (NH₄)₂SO₄; 10,0 KH₂PO₄; 0,5 MgSO₄.7H₂O; 1,0 CaCl₂; 25 mL óleo de soja; 8,0 de emulsificante (Tween 80); 5 mL de solução de elementos traços (22,0 Zn SO₄.7H₂O; 11,0 de H₃BO₃; 5,0 MnCl₂.4H₂O; 5,0 FeSO₄.7H₂O; 1,6 CoCl₂.5H₂O; 1,6 de CuSO₄.5H₂O; 1,1 (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 50,0 de EDTA) e corrigindo-se o pH para 6,0 .

4.1.4 Biorreator de bancada em leito fixo

Foram utilizados dois tipos de biorreatores de leito fixo nos experimentos, um de vidro, com capacidade para 50 g, e um de aço inox com capacidade de 200 g, este último desenvolvido e aperfeiçoado por Lauretino (2007), Umsza-Guez (2009) e Zanelato (2011). O diagrama geral, para ambos os reatores, é apresentado na Figura 4.1. O ar, proveniente de um compressor radial (1), foi filtrado para remoção de impurezas mais grosseiras por um filtro cerâmico (2), e teve sua vazão medida por um conjunto de rotâmetros (3). Após esta etapa, o ar foi umidificado e sua temperatura controlada, quando forçado a percolar o sistema umidificação, constituído por um recipiente hermeticamente fechado, preenchido com esferas de vidro de 3 mm de diâmetro e cheio de água (4). O recipiente ficou mergulhado em banho termostático, com a temperatura regulada adequadamente para cada tipo de fungo (5). O ar foi injetado no fermentador (8) de forma ascendente e retirado para a atmosfera pelo topo da coluna. A temperatura da camisa foi mantida pela recirculação (7) de água com a temperatura regulada adequadamente para cada tipo de fungo por um banho termostático (6).

O fermentador de vidro, Figura 4.2, possuía 27,0 cm de comprimento, diâmetro interno de 5,0 cm e diâmetro externo de 7,0 cm, escoando água no espaço anular. O fermentador em aço-inox, Figura 4.3, era composto por 6 módulos, cada um dos quais composto por dois cilindros concêntricos, tendo o interno 7,62 cm de diâmetro e o externo 9,25 cm, ambos de 10 cm de comprimento, escoando água no espaço anular entre ambos.

4.2 Métodos Experimentais

4.2.1 Fermentação em Sacos de Polipropileno

4.2.1.1 Pré-inóculo

O meio para a produção de esporos foi constituído por meio BDA para *M. anisopliae* ICB 421 e Saboraud para *T. indiciae-seudaticae* N31, dispostos em frascos Erlenmeyer (250 mL), nos quais foram repicados os esporos dos fungos. Após o período próprio de cultivo de cada fungo (14 dias para *M. anisopliae* e 3 dias

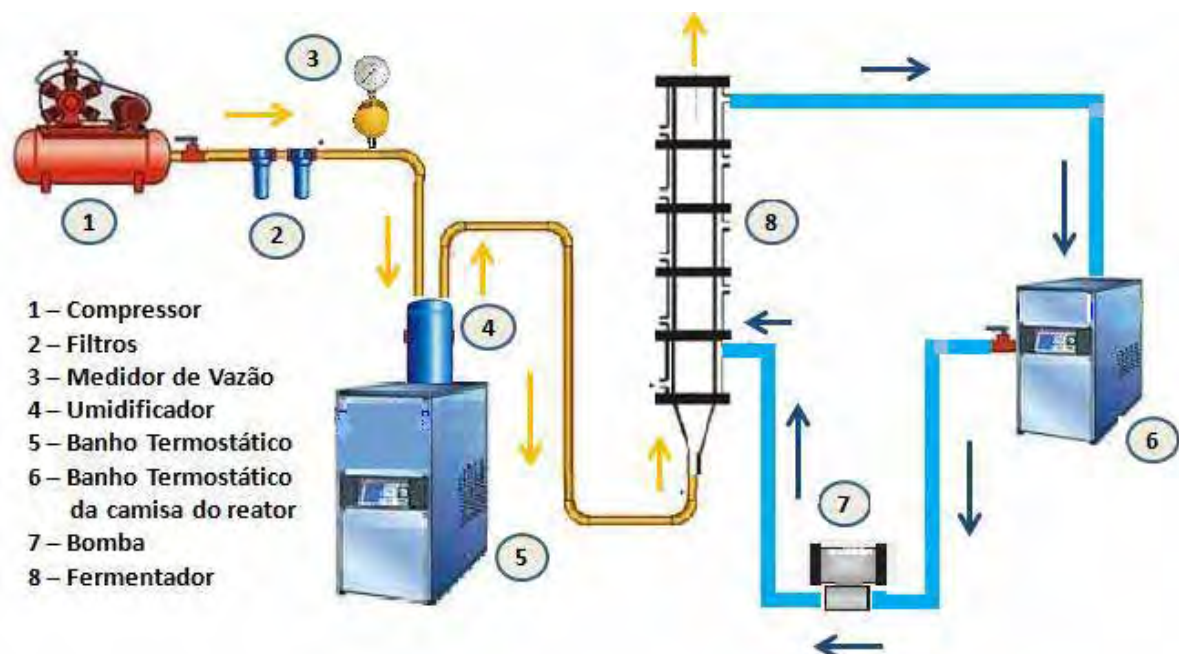


Figura 4.1: Diagrama geral do aparato experimental

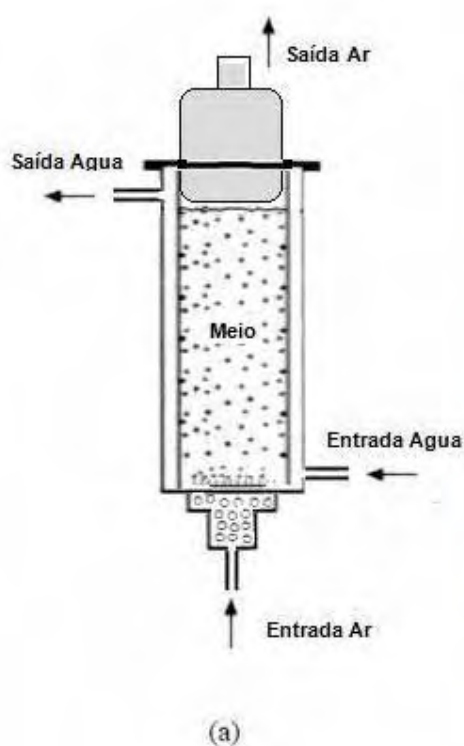


Figura 4.2: Biorreator de vidro de bancada utilizado na FES
 (a – Diagrama Esquemático, b – Vista Lateral)

para *T. indicae-sedaticae* N31), os esporos foram suspensos em solução nutritiva, com o auxílio de alça de platina. A contagem de esporos na suspensão foi feita utilizando câmara de Neubauer e foram utilizados volumes de suspensão suficientes para se obter inóculos com concentração de esporos de $10^5/\text{mL}$ para *T. indicae-seudaticae* N31 e 10^7 esporo/mL para *M. anisopliae* ICB 42, concentrações utilizadas por Ferrarezi (2011) e Beys Silva et al (2005), respectivamente .

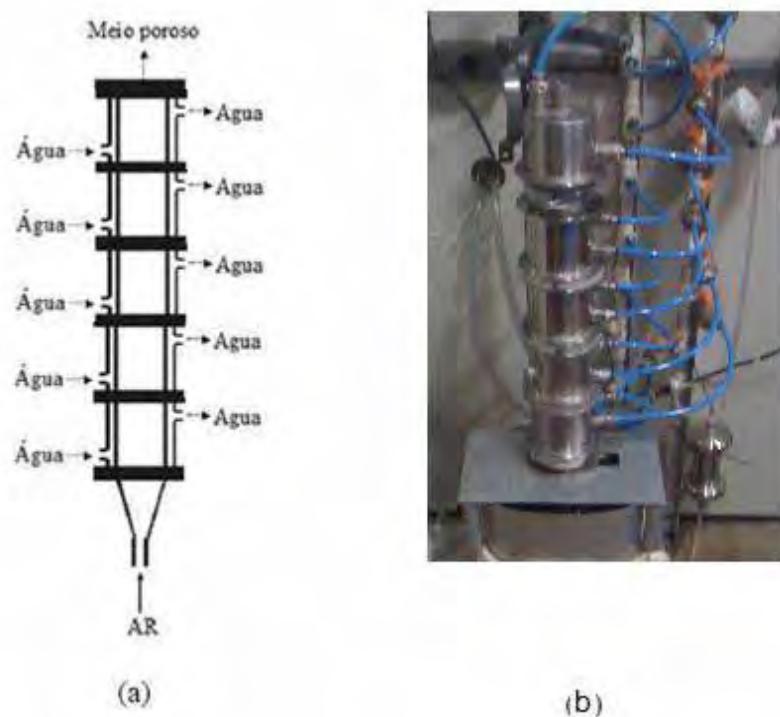


Figura 4.3: Biorreator de aço inox de bancada utilizado na FES
(a – Diagrama Esquemático, b – Vista Lateral)

4.2.1.2 *Metarhizium anisopliae* ICB 421

A FES foi realizada em sacos de polipropileno (20,5 cm x 15 cm), contendo 5g de meio. Foram testadas 4 proporções para um meio de cultivo composto por bagaço de cana (BC), farelo de trigo (FT) e soja moída (S): 70% BC e 30% FT; 50% BC, 25% FT e 25% S; 40% BC, 30% FT e 30% S; 30% BC, 35% FT e 35% S. Os ensaios foram organizados da seguinte forma:

1º Teste – O substrato composto por 70% bagaço de cana e 30% farelo de trigo foi inoculado com solução nutriente contendo 0,3 mL de óleo de soja em sua composição e com umidade 70%, seguindo-se recomendação de Ferrarezi (2011);

2º Teste – Substrato composto por 50% bagaço de cana, 25% farelo de trigo e 25% soja, retirando-se o óleo da composição da solução nutriente;

3º Teste – Como o 2º teste forneceu melhores resultados, com este meio de cultivo foi avaliada a influência da temperatura, com o experimento sendo conduzido com três níveis de temperatura: 23°C, 28°C e 33°C.

4º Teste – Após encontrada a melhor temperatura, foi testada a redução do BC, uma vez que serve apenas de suporte. Foram comparadas as proporções 50%BC, 25%FT e 25%S e 20%BC, 40%FT e 40%S.

5º Teste – Após determinadas as melhores condições de produção nos 3º e 4º testes, foram realizados ensaios em função do tempo de cultivo. Para tanto, vinte sacos foram mantidos nas condições determinadas e a cada 24 horas, dois sacos foram retirados e a atividade lipolítica determinada.

Os meios de cultivo acondicionados nos sacos plásticos foram inoculados, com a suspensão de esporos, seguindo-se de cultivo por 7 dias. O volume de solução inoculante conferiu ao substrato a umidade de 70% e a incubação ocorreu a 28°C. Após a fermentação, foi obtida a solução enzimática bruta, pela adição de 50 mL de Tween 0,5% ao meio fermentado, que foi misturado levemente, agitado em *shaker* a 100 rpm por 30 minutos e filtrado à vácuo. O filtrado foi centrifugado a 10.000g, a 10°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado como solução enzimática bruta.

4.2.2.3 *Thermomucor indicae-seudaticae* N31

A FES foi realizada em sacos de polipropileno, contendo 5g de meio de cultivo com duas composições distintas: 100% BC e 50% BC, 25% FT e 25% S.

Inicialmente, foram empregadas as condições ótimas obtidas por FERRAREZI (2011) para cultivo de *T. indicae-seudaticae* N31, quais sejam: temperatura de 45°C,

teor de umidade do meio 70%, concentração de 10^5 esporos/mL e tempo de fermentação de 24h. A sequência dos experimentos foi similar à empregada com *M. anisopliae*, quais sejam:

1º Teste – Neste experimento foi empregada a condição experimental ótima obtida por FERRAREZI (2011), na qual o meio foi composto por 100% bagaço de cana e inoculado com solução nutriente acrescida de 0,3 mL de óleo de soja;

2º Teste – Neste teste, farelo de trigo foi empregado como indutor do crescimento do fungo, sendo utilizado na proporção 70% BC e 30% FT, mantendo-se óleo de soja como indutor de produção das enzimas;

3º Teste – Soja moída foi empregada como única fonte lipídica. A composição do meio foi alterada para 50% BC, 25% FT e 25% S e foi retirado o óleo de soja.

Encontrada a condição mais adequada para produção de enzimas pelo microrganismo nos três testes anteriores, estes parâmetros foram fixados e empregados como referência para o teste a seguir:

4º Teste – Estudo sobre a variação da atividade enzimática em função do tempo de cultivo. Para tanto, dez sacos foram mantidos nas condições de referência e a cada 24 horas, dois sacos foram retirados e a atividade da lipase mensurada.

Após a fermentação, foi obtida a solução enzimática bruta, como descrito para o fungo *M. anisopliae* no item 4.2.2.

4.2.2 Fermentação no biorreator

Nesta etapa, as condições ótimas obtidas para os fungos *Metarhizium anisopliae* ICB 421 e *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 nos sacos plásticos, foram aplicadas ao biorreator e o delineamento dos experimentos foi semelhante para ambos os fungos, sendo diferenciados apenas nas condições específicas de fermentação de cada fungo. Foram utilizados dois tipos de biorreator, a fermentação foi realizada com aproximadamente 50 g de substrato para biorreator vidro e 200g de substrato para biorreator de aço-inox, que foi inoculado com a suspensão de esporos enriquecida pela solução nutriente. A inoculação foi feita em sacos de

polipropileno contendo o substrato esterilizado. Posteriormente este material foi empacotado assepticamente no reator.

Foram aplicadas aos reatores as melhores condições encontradas na escala de sacos para cada fungo. No reator, foram observadas a influência das variáveis vazão volumétrica de ar percolante e a umidade do meio, no perfil longitudinal de atividade enzimática, sendo empregadas as vazões de 80 L/h e 180 L/h, com ar mantido à umidade de 95%, e a umidade inicial do meio de 70% e 80%.

O leito foi subdividido em porções iguais e foram determinadas a atividade enzimática e a umidade final de cada uma destas porções. A umidade foi determinada pelo método gravimétrico em estufa de convecção forçada a 80°C até a obtenção de peso constante.

4.2.3 Análise da atividade lipolítica por hidrólise de substrato cromogênico

Este método de hidrólise foi proposto por Winkler & Stukmann (1979), sendo modificado conforme Krieger (1995) e utilizado por Ferrarezi (2011). O substrato sintético utilizado, o p-nitrofenil palmitato (pNPP), foi hidrolisado pela enzima, em meio aquoso contendo como emulsificantes goma arábica e Triton X-100. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 μmol de pNP (pnitrofenol) por min nas condições da reação. O coeficiente de extinção molar do pNP utilizado foi $8,03 \times 10^{-3} \text{ M.L}^{-1}$, extraído de Lima et al. (2004).

Soluções utilizadas:

- ✓ Solução A: p-nitrofenil palmitato em isopropanol, em concentração de 3 mg/mL.
- ✓ Solução B: 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica, em 450 mL tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0.

A 9 mL da solução B foi misturado 1 mL da solução A, lentamente e sob contínua agitação, para o preparo da solução de substrato. Foi utilizado 0,9 mL da solução pronta e adicionado 0,1 mL do extrato enzimático. A reação foi incubada a

45°C para *T. indicae-seudaticae* N31 e 35°C para *M. anisopliae* ICB 421 por 1 minuto, e a absorção lida em espectrofotômetro a 410 nm.

4.2.4 Reação de Transesterificação

Dos melhores resultados para produção de lipases nos sacos plásticos e no biorreator foram feitos testes específicos para avaliar se as enzimas transesterificam óleo de soja.

O ensaio padrão de transesterificação foi realizado através da metodologia modificada de Castro (2005), utilizando óleo de soja e álcool etílico 99 %, na razão molar 1:6 (óleo/álcool) e 10 % de catalisador (enzima livre ou imobilizada) relação ao meio reacional, totalizando 5,0 g de meio, sob agitação de 150 rpm. As reações foram realizadas a 37°C utilizando n-hexano como solvente da reação na proporção v/v 1:1,5 óleo/n-hexano. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e analisado por cromatografia gasosa (CG-FID).

4.2.5 Análise dos ésteres por Cromatografia Gasosa (CG)

A quantificação dos ésteres etílicos foi realizada por cromatográfica gasosa utilizando detector de ionização de chama (GC-FID). 1 µL de cada amostra centrifugada e diluída foi injetado em um Cromatógrafo HP 5890 serie II e coluna SPB-35 (SUPELCO), usando o software Totalchrom (Perkin Elmer). A programação térmica foi de 160 a 180°C, mantendo uma taxa de aquecimento de 4°C por minuto, e de 180 a 235°C a 6°C/min. As temperaturas do injetor e do detector foram iguais a 250°C, utilizando-se o gás nitrogênio como gás de arraste (split 1:30, pressão cabeça da coluna: 100 kPa).

A curva de calibração foi construída utilizando ésteres com pureza acima de 98 % (Sigma-Aldrich), como o linoleato de etila, linolenato de etila, oleato de etila, palmitato de etila e estearato de etila. E calculou-se o rendimento das reações de sínteses segundo proposto por Urioste et al. (2008).

Para o cálculo do rendimento da síntese de biodiesel foi utilizada a Equação 1:

$$R (\%) = \frac{M_t}{M_e} \times 100 \quad (1)$$

Onde Me é a massa teórica esperada de ésteres produzidos e Mt é a massa obtida dos ésteres, calculada de acordo com a curva de calibração feita com os padrões analíticos.

Para o cálculo do Me da equação 1, foi necessário usar a equação 2:

$$M_e = \frac{M_o \times MMe}{MMA} \quad (2)$$

E a equação 3:

$$M_o = Ca \times M_i \quad (3)$$

Onde Mo é a massa inicial dos ácidos graxos presente no óleo, MMA é a massa molecular de cada ácido graxo, MMe é a massa molecular de cada éster correspondente, Ca é a concentração de cada ácido graxo e Mi é a massa inicial de óleo.

Pelas Equações 2 e 3, os valores de Me e o Mo de cada ácido graxo foram calculados e somados para a obtenção da massa teórica esperada do óleo, em seguida aplicada na Equação 1 para o cálculo, em porcentagem, do rendimento da síntese de biodiesel. A concentração de cada ácido graxo presente no óleo foi obtida de acordo com a metodologia proposta por Lanças (1993).

Utilizando-se essas equações também foi possível calcular a massa de ésteres produzida por grama de óleo utilizada na reação (Equação 4):

$$g \text{ de Éster} / g \text{ de óleo} = \frac{M_t}{M_i} \quad (4)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Fermentação em Sacos Plásticos

5.1.1 *Metarhizium anisopliae* ICB 421

O 1º Teste fermentativo, quando o substrato era composto por 70% bagaço de cana (BC) e 30% farelo de trigo (FT), e suplementado com solução nutriente que continha óleo de soja em sua composição, apresentou atividade lipolítica média de 3,29 U/gss. O fungo apresentou visualmente crescimento lento, e seu desenvolvimento se iniciava ao redor das partículas do farelo de trigo. Também foi observado que o FT se hidrata rapidamente quando comparado ao BC.

Já no 2º Teste, quando a soja foi introduzida como fonte lipídica, em substituição ao óleo de soja, a atividade média obtida foi de 13,41 U/gss. O substrato, composto por 50% bagaço de cana (BC), 25% farelo de trigo (FT) e 25% soja (S), apresenta vantagem em relação ao anterior, uma vez que o óleo de soja já é um produto resultante de um processo industrial, enquanto que a soja é um material *in natura*. Evidentemente, há a controvérsia de se utilizar um grão destinado a consumo humano para a produção de biomateriais, mas tal discussão não deve ser confundida com aquela que se observa nos Estados Unidos a respeito do uso de milho para a produção de álcool, pois as necessidades industriais por enzimas lipolíticas não consumiriam quantidades expressivas de grãos de soja.

Beys Silva et al. (2005), utilizando o fungo *M. anisopliae*, obtiveram uma atividade de lipase de 49,7 U/gss. No entanto, estes autores realizaram a fermentação em meio nutriente (agar) enriquecido com solução nutriente e não em meio composto. A literatura não apresenta outros exemplos de produção de lipase por *M. anisopliae*.

Foi observado também, que o fungo apresenta visualmente um maior crescimento quando comparado ao crescimento do teste anterior, e uma colonização mais efetiva de todo o substrato.

Assim, os testes seguintes foram realizados com soja moída como indutor da metabolização das lipases.

No 3º Teste foi avaliada a influência da temperatura na atividade da enzima, com o experimento sendo conduzido com 3 níveis diferentes de temperatura, 23°C, 28°C e 33°C, sendo os resultados apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Atividade lipolítica das enzimas produzidas por *M. anisopliae* ICB 421 com variação da temperatura, à umidade 70% e meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S

Temperatura	U/gss
23°C	4,12
28°C	13,71
33°C	7,41

Para as três temperaturas utilizadas observa-se que a de 28°C, foi a que proporcionou o melhor resultado. De acordo com ROSATO et al. (1981) e BEYS DA SILVA et al. (2010) a temperatura de 28°C é a ideal para o desenvolvimento deste fungo entomopatogênico.

No 4º Teste foi feita a avaliação da composição do meio, onde a proporção de 20% bagaço de cana, 40% farelo de trigo e 40% soja apresentou uma redução de 14,4% na atividade enzimática quando comparado ao meio com 50% bagaço de cana, 25% farelo de trigo e 25% soja, como pode ser visto na Tabela 5.2. Como a função do bagaço de cana é de estruturar o meio fermentativo, conferindo os espaços intersticiais para uma aeração eficiente e possibilitando o acesso do microrganismo a uma porção maior do indutor das enzimas, pode ter havido compactação indesejada do meio. O crescimento do microrganismo e a colonização do substrato foram visualmente semelhantes para ambas as proporções, porém o meio com 20% BC 40%FT e 40%S, apresentou uma maior incidência de sacos com ausência de crescimento aparente. Ainda assim, uma análise estatística mais apurada, com um maior número de repetições, seria necessária para que conclusão mais efetiva pudesse ser feita.

Tabela 5.2: Atividade lipolítica *M. anisopliae* ICB 421 para avaliação da redução do volume de suporte (BC) e aumento volume dos indutores, à 28°C e 70% umidade

Composição Meio	U/gss
50%BC 25%FT 25%S	8,26
20%BC 40%FT 40%S	7,08

A variação da umidade do meio ocasionou alteração de 17,5% na produção de enzimas, como pode ser visto na Tabela 5.3, com o meio a 70% de umidade sendo mais propício para a produção em relação ao meio a 80%. Nos ensaios com umidade de 80%, a umidificação do meio foi heterogênea, com acúmulo de água no fundo do saco, mesmo após a homogeneização. Este excesso de água afeta negativamente as trocas gasosas e, conseqüentemente, o metabolismo microbiano. Além disso, o bagaço de cana tem uma absorção de umidade mais lenta do que o farelo de trigo (ZANELATO, 2011), e não se sabe se o mesmo ocorre com a soja, de modo que o indutor de crescimento do fungo e, possivelmente o indutor das enzimas, estavam saturados de água.

Tabela 5.3: Atividade lipolítica *M. anisopliae* ICB 421 com variação da umidade inicial, com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S e à 28°C

Umidade Inicial	U/gss
70%	11,23
80%	9,27

O 5º Teste foi realizado fixando-se a temperatura de cultivo em 28°C, a umidade do meio em 70% e a composição do meio em 50%BC, 25%FT e 25%S, sendo agora avaliada a atividade enzimática em função do tempo de fermentação, cujo resultado é apresentado pela Figura 5.1, onde % ($A_e/A_{e_{max}}$) representa a normalização das atividades diárias pela máxima atividade obtida aos cinco dias de

ensaio. Note-se que a atividade enzimática atinge um valor praticamente estável com cinco dias de fermentação, que foi adotada como atividade enzimática máxima.

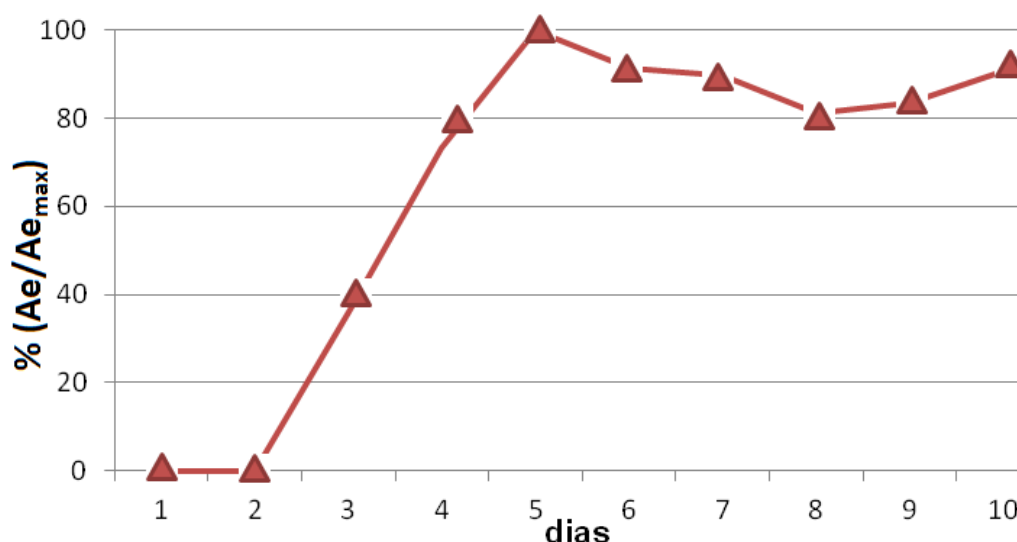


Figura 5.1. Atividade lipolítica das enzimas produzidas por *M. anisopliae* em função do tempo à 28°C, com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S e umidade 70%

Ao final dos experimentos na escala de sacos, foram definidas as condições ótimas de fermentação como sendo 28°C de temperatura de incubação, cinco dias de fermentação, composição do meio com 50% BC, 25% FT e 25% S e umidade 70%(b.u.) a serem aplicados no biorreator para fermentações com o fungo *Metarhizium anisopliae* ICB 421.

5.1.2 *Thermomucor indicae-seudaticae* N31

No 1º Teste foram utilizadas as condições ótimas obtidas por FERRAREZI (2011). O meio foi composto por 100% bagaço de cana, suplementado com a solução nutriente que continha óleo de soja em sua composição. Nestas condições, foi obtida a atividade enzimática média de 1,68 U/gss. Este resultado é muito inferior ao obtido por FERRAREZI (2011), que obteve atividade de 15,69 U/gss. Essa dificuldade de se repetir os resultados para este fungo foi observada em ensaios

posteriores pelo mesmo autor, mesmo após sucessivas tentativas de reativação da cepa (resultados não publicados). A cepa que vinha sendo utilizada e uma conservada à -80°C foram repicadas seis vezes em meio nutriente de aveia, porém a atividade enzimática da lipase continuou abaixo dos valores obtidos anteriormente. O fungo apresentou um bom crescimento, porém a incidência de experimentos onde não havia crescimento aparente se manteve em torno entre 15% do sacos.

Dentre as causas para avaliar a dificuldade para se replicar os resultados, pode-se ressaltar os fatores que afetam os processos FES de um modo geral, tais como variações genéticas do microrganismo, variabilidade da composição do substrato e os parâmetros de cultivo, principalmente temperatura e umidade. Assim pode ter ocorrido divergência entre os substratos utilizados, que eram provenientes de fontes diferentes, armazenados de forma e por tempo diferente, divergência na metodologia utilizada, mesmo que sutis, e por fim a possibilidade da cepa estar em estágio de maturação diferente ou ter sofrido alguma forma de mutação durante o período em que foi utilizada e armazenada no intervalo entre os trabalhos de Ferrarezzi (2011) e os realizados nesta dissertação.

No 2º Teste, o farelo de trigo foi empregado como indutor do crescimento do fungo, sendo utilizado na proporção 70% BC e 30% FT. A produção média de enzima foi cerca de 50% maior que a média de produção para condições do 1º Teste, ou seja, 2,52 U/gss. Visualmente, observou-se que o crescimento do fungo no Teste 2 foi superior ao apresentado no Teste 1, e a incidência de experimentos sem crescimento aparente foi menor no Teste 2, o que significa que a solução nutriente utilizada não contém todos os compostos necessários ao crescimento fúngico, sendo necessário um indutor adicional de crescimento.

No 3º Teste, a soja moída foi testada como única fonte lipídica. As condições de fermentação foram mantidas e a composição do meio alterada para 50% BC, 25% FT e 25% S, e foi retirado o óleo de soja da composição da solução nutriente. Nestas condições, a atividade enzimática média foi 11,5% maior que a média obtida para os condições do no 2º Teste, ou seja 2,81 U/gss. Visualmente, o comportamento do fungo, quando comparados os Testes 2 e 3, apresentou

características de crescimento semelhantes, bem como de incidência de experimentos sem crescimento aparente.

No 4º Teste foi avaliada a dependência da atividade enzimática com o tempo de cultivo, fixando-se a composição do meio em 50% BC, 25% FT e 25% S. Dez sacos foram mantidos nas condições de referência e a cada 24 horas dois sacos foram retirados e a atividade lipolítica mensurada, sendo os resultados apresentados pela Figura 5.2. Note-se que a condição ótima de cultivo ocorreu em dois dias de fermentação, resultando em enzimas com atividades iguais a 2,98 U/gss. Como a atividade das enzimas produzidas foram quase o dobro das produzidas com um dia de fermentação, estudos mais detalhados de aplicação específica devem ser feitos para avaliar se, em condições industriais de produção das enzimas, os custos de se manter o sistema operando por 48h são compensados por este aumento de atividade. Ferrarezi (2011) em seus ensaios atividade enzimática obteve 0,12 U/gss em 48 horas de fermentação.

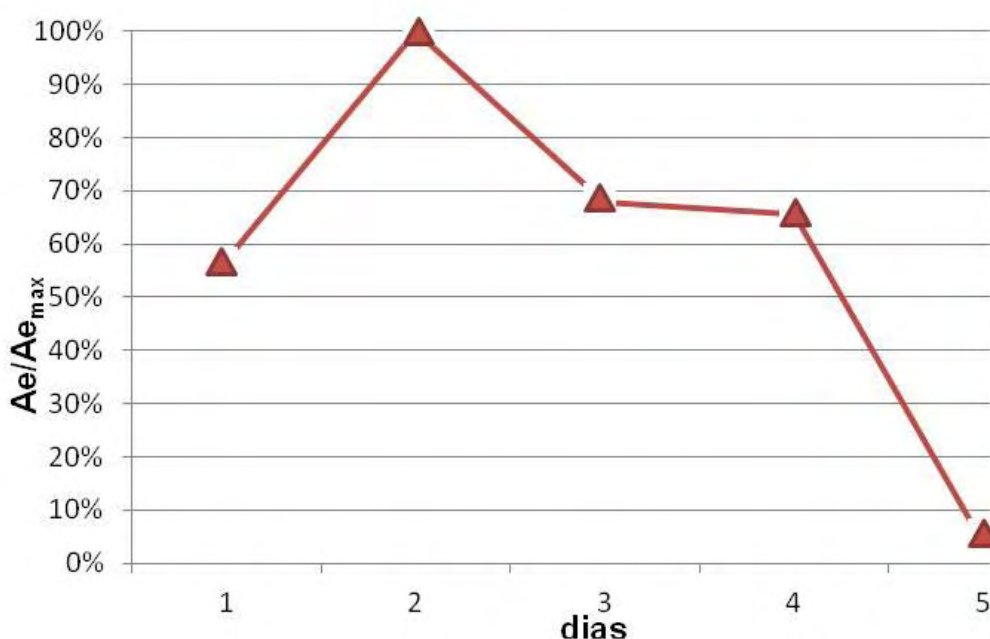


Figura 5.2. Atividade lipolítica das enzimas produzidas por *T. indicae-seudaticae* N31 em função do tempo à 45 °C, com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S e umidade 70%

Ao final dos experimentos na escala de sacos, diferentemente do que apresentou Ferrarezi (2011) em relação ao tempo de cultivo, foram definidos os parâmetros de 45°C de temperatura de incubação, por dois dias de cultivo, composição do meio com 50% BC, 25% FT e 25% S e umidade 70% para os ensaios realizados no biorreator para fermentações com o fungo *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31.

5.2 Fermentação em Biorreator

Após a etapa de sacos, os parâmetros que proporcionaram maiores atividades enzimáticas foram aplicados à fermentação em escala ampliada. Inicialmente houve aumento de dez vezes na massa de material a ser fermentado (50g no biorreator) e alguns testes foram feitos aumentando-se a escala em quarenta vezes (200 g de meio reacional).

5.2.1 *Metarhizium anisopliae* ICB 421

As condições de cultivo empregadas em todos os ensaios foram: meio composto por 50%BC, 25%FT e 25%S, temperatura 28°C e concentração de esporos 10^7 esporos/mL. Estes ensaios foram realizados nas colunas de vidro e a Figura 5.3 mostra o esquema de retirada de amostras neste fermentador. Foram variadas a vazão de ar (80 e 180 L/h) e a umidade inicial do meio (70 e 80%), sendo os resultados resumidos na Tabela 5.4.

A Figura 5.4 apresenta os perfis longitudinais de atividade enzimática, onde se pode observar que a atividade das enzimas são maiores para a menor umidade do meio poroso, indicando que para a maior umidade pode ter havido a ocorrência de água livre nos interstícios, dificultando a aeração do meio e comprometendo o desenvolvimento do fungo. Também se observa que as atividades das enzimas produzidas na porção mediana do leito são superiores às das extremidades para a umidade inicial de 70%, indicando que esta porção mantém as condições de cultivo mais adequadas ao metabolismo microbiano.

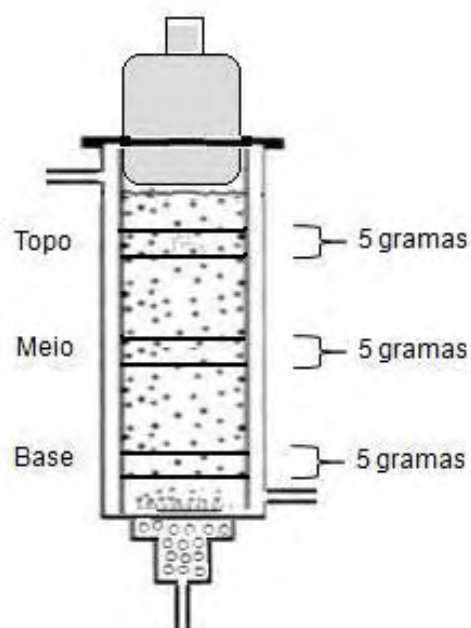


Figura 5.3: Esquema dos pontos de amostragem no reator de vidro.

Tabela 5.4: Atividade da lipase produzida por *M. anisopliae* ICB 421 em função da variação da umidade inicial do meio e da vazão no biorreator de vidro, à 28°C, com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S

Umidade inicial do meio	Vazão L/h	U/gss
70%	80	2,59
70%	180	5,61
80%	80	0,77
80%	180	2,81

A Figura 5.5 apresenta os resultados a diferentes teores iniciais de umidade para a vazão de 180L/h, notando-se comportamento similar ao observado para a vazão de 80L/h, (Figura 5.4). Na média de todo o leito, os resultados para a vazão de 180L/h são superiores aos da vazão de 80L/h, como pode ser visto na Tabela

5.4. Comparando-se com as atividades obtidas nos sacos, também a 70% de umidade, observou-se, que eles são inferiores aos obtidos inicialmente, cerca de 13 U/gss, indicando dificuldade em se manter as condições ótimas de cultivo sob condições dinâmicas. Há uma tendência de aumento de atividade enzimática com o aumento da vazão de ar, indicando que o aumento da oferta de oxigênio favorece a atividade enzimática. Na Figura 5.6 pode-se observar que a atividade enzimática média foram próximas para ambas as umidades, dando mostras que há certa flexibilidade operacional em relação a esta variável.

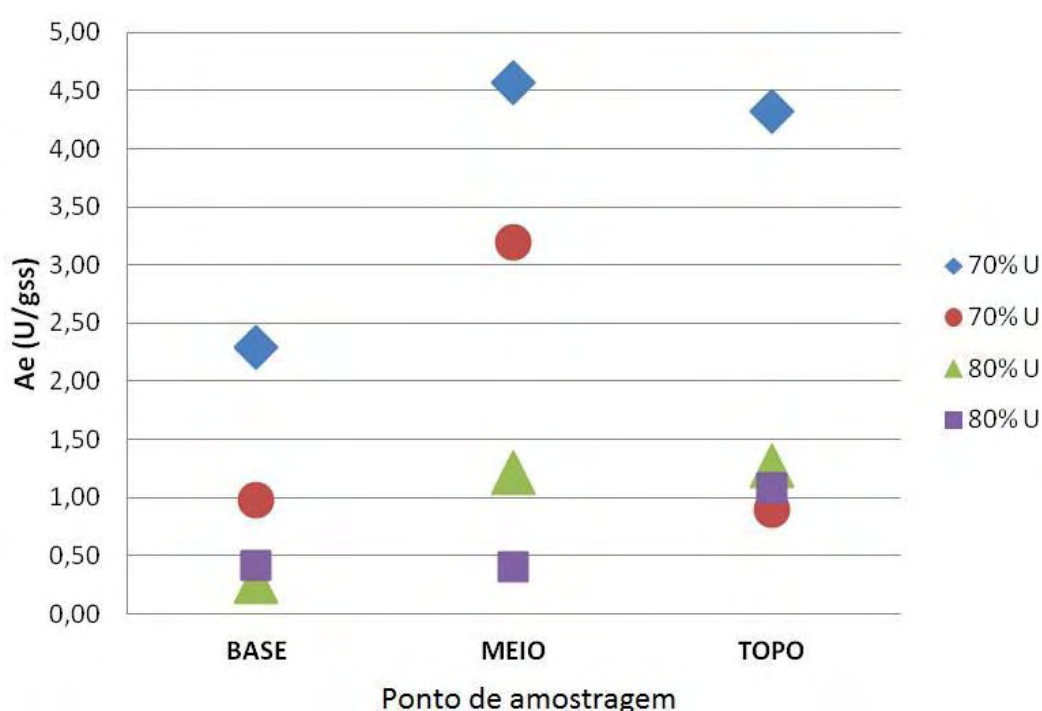


Figura 5.4: Atividade da lipase produzida pelo fungo *M.anisopliae* ICB 421, em biorreator, com variação da umidade inicial do meio e vazão de ar 80L/h, à 28°C, com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S

A Figura 5.6 também apresenta o perfil longitudinal de umidade para os ensaios realizados a 180L/h e 70 e 80% de umidade inicial do meio de cultura. Note-se que houve grande alteração da umidade, mas com características distintas das descritas por Umsza Guez (2009) e Zanelato (2011), que observaram uma tendência crescente de umidade da base para o topo. Deve-se considerar que os fungos empregados por estes autores eram termófilos e que as temperaturas de

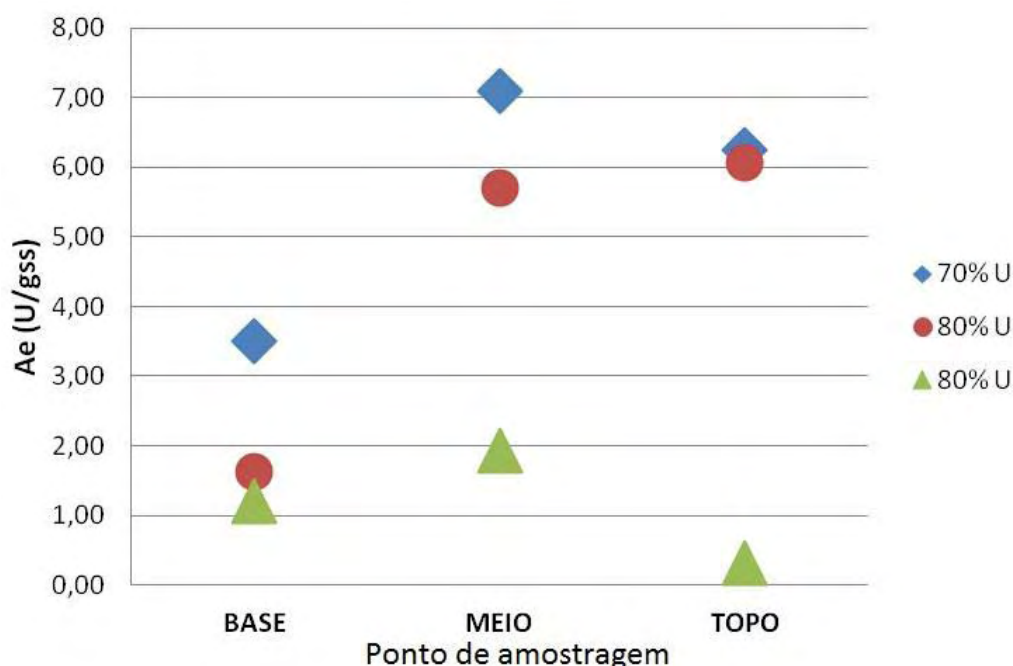


Figura 5.5 – Atividade da lipase produzida pelo fungo *M.anisopliae* ICB 421, em biorreator, com variação da umidade do meio e vazão de ar 180L/h, à 28°C, com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S

cultivo foram sempre iguais ou superiores a 45°C, enquanto que nos ensaios com *M. anisopliae* a temperatura de cultivo foi de 28°C. No caso de experimentos a temperaturas elevadas, o ar saturado deixa o fermentador a uma temperatura acima da temperatura ambiente, de modo que a umidade excedente retorna como água líquida ao reator, umidificando as porções superiores do leito. Nos ensaios com *M. anisopliae*, a temperatura da reação era igual ou inferior à temperatura ambiente, em geral 30°C, de modo que havia potencial para a secagem das porções superiores do leito, comprometendo a produção das enzimas.

A umidade média final nos reatores de vidro após 5 dias de fermentação, apresentou-se semelhante para as condições de 70 e 80% de umidade inicial do meio, que foi reduzida a cerca de 55% após os ensaios, indicando que há uma resistência à transferência de massa do reator para o ambiente que torna o excesso de água no interior do reator um fator não limitante. De um modo geral tal redução de umidade foi desfavorável à metabolização das enzimas, se comparados os resultados no biorreator com os da escala de sacos. O fato da porção intermediária

do leito resultar em enzimas mais ativas pode indicar que durante a fase mais crucial do crescimento do fungo e produção das enzimas, fase de crescimento logarítmico, a umidade do meio esteve em níveis adequados.

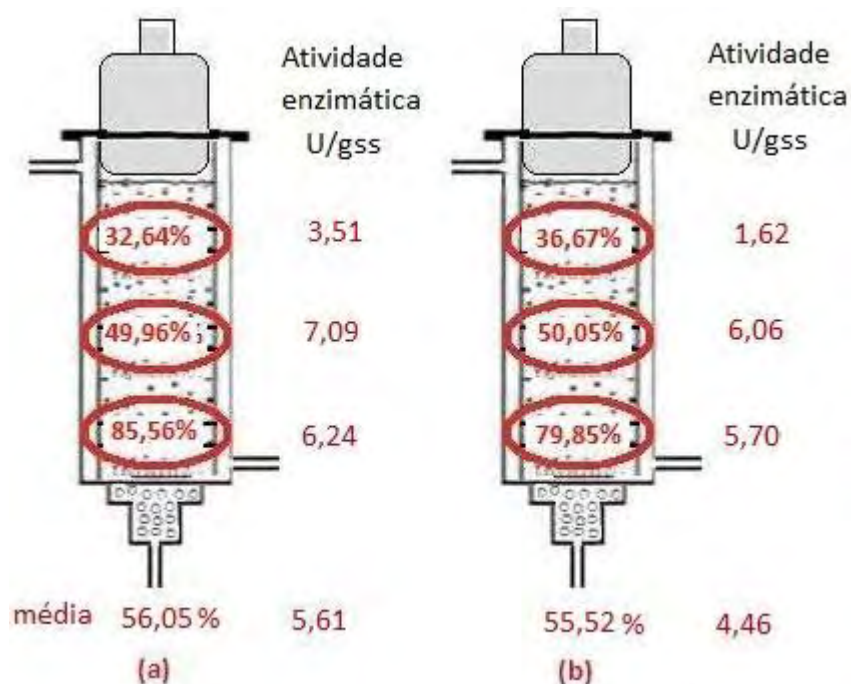


Figura 5.6 – Distribuição da atividade enzimática e umidade do meio após ensaios com umidade inicial de em (a) 70% e (b) 80%

A escala do experimento foi novamente aumentada para *M.anisopliae*, a fim de se produzir enzimas para o ensaio de transesterificação. O reator em aço-inox desenvolvido por Laurentino (2007), Umsza-Guez (2009) e Zanelato (2011) foi utilizado, com vazão igual a 180L/h e teor de umidade inicial de 70%, resultando em uma atividade enzimática média de 7,49 U/gss, um valor próximo ao obtido no reator de vidro, indicando que não devem ser esperados problemas graves de ampliação de escala neste processo fermentativo para esta classe de fermentador.

O ensaio de transesterificação apresentou que a enzima produzida pelo fungo *M. anisopliae* ICB 421 tem um rendimento inferior a 1%, dentro da exatidão do método de análise, o que torna inviável a sua utilização para produção de biodiesel,

A título de comparação, Bajaj et al. (2010) apresentam valores de rendimento entre 70 e 98% para enzimas comerciais e GOG et al. (2012) apresentam revisão sobre rendimento de transesterificação que variam de 45,5 a 98% também utilizando enzimas comerciais.

5.2.2 *Thermomucor indicae-seudaticae* N31

As condições adotadas em todos os ensaios foram: meio composto por 50%BC, 25%FT e 25%S e concentração de esporos 5×10^5 esporos/mL. Estes ensaios foram realizados nas colunas de vidro e foram variadas a vazão de ar (80 e 180 L/h) e a umidade inicial do meio (70 e 80%).

De um modo geral, o comportamento da atividade enzimática com o comprimento do leito nos ensaios com *T. indicae-sedaticae* foi similar ao observado com *M. anisopliae*, ou seja, a maior atividade enzimática ocorreu no centro do leito, como pode ser visto na Figura 5.7, a menos da maior vazão (180L/h) associada à maior umidade (80%), cujo resultado para o topo do leito apresentou maior atividade. Ademais, os resultados para a umidade de 70% foram superiores aos de 80%. A vazão de gás não proporcionou grandes alterações na atividade enzimática, como pode ser constatado comparando-se as Figuras 5.7 e 5.8. Possivelmente, o fato de trabalhar-se com temperaturas mais elevadas e havendo o efeito de retorno de água líquida para o topo do fermentador evitou a secagem das porções mais elevadas do meio poroso, de onde se conclui que teores de umidade muito inferiores ao ótimo observado na escala de sacos são mais deletérios ao microrganismo do que teores muito acima.

Em síntese, os resultados para 70% de umidade inicial do meio sólido são, em média, 69% superiores aos de 80% na vazão de 80L/h e 90% na de 180L/h. Os resultados obtidos na escala de sacos e no biorreator, são semelhantes para o fungo *T. indicae-seudaticae* N31, mostrando que o aumento de escala não foi o responsável pela não obtenção de valores encontrados por Ferrarezi (2011).

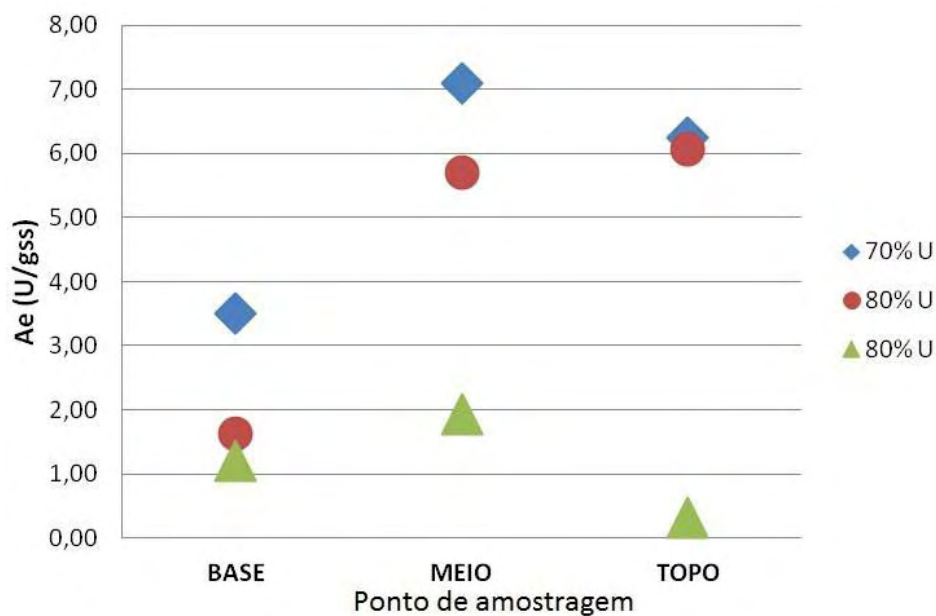


Figura 5.7: Atividade da lipase produzida pelo fungo *T. indicae-seudaticae* N31, em biorreator, com variação da umidade do meio e vazão de ar 80L/h à 45°C, com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S

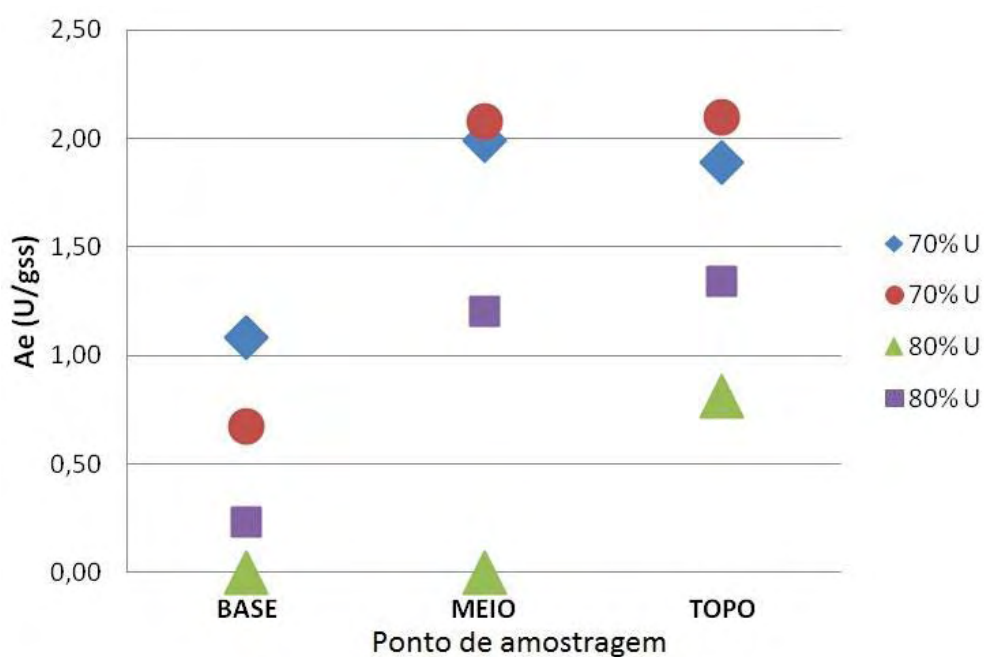


Figura 5.8: Atividade da lipase produzida pelo fungo *T. indicae-seudaticae* N31, em biorreator, com variação da umidade do meio e vazão de ar 180L/h à 28°C, com meio composto 50%BC, 25%FT e 25%S

Devido a problemas operacionais, não foi possível realizar os ensaios de transposição de escala para o biorreator de aço-inoxidável.

A análise da lipase produzida pelo fungo *T. indicae-seudaticae* N31, realizada com auxílio de Ferrarezi (resultados não publicados), indicou rendimento na transesterificação com óleo de soja de 13%, índice este, que mostra a capacidade da enzima produzida pelo microrganismo de realizar a transesterificação e que pode ser maximizado com aprofundamento dos estudos.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 Conclusões

O fungo mesofílico utilizado neste trabalho, *M. anisopliae* ICB 421, demonstrou que tem um bom potencial para a produção de lipase, embora a capacidade de transesterificação desta enzima tenha sido muito baixa, descartando-o para aplicação na produção enzimática de biodiesel.

Para escala de saco as condições ótimas de fermentação foi obtida quando se utilizou meio contendo 50% BC, 25%FT e 25%S, sem a presença de óleo de soja na solução nutriente, com umidade inicial de 70%, 28°C e cinco dias de fermentação, para uma atividade enzimática de 11,23 U/gss

Os resultados para a escala de sacos e para os biorreatores de bancada, com ampliação de escala de 10 e de 40 vezes, foram similares, indicando boa adaptação do fungo às condições de fermentação em biorreator. A umidade ideal para fermentação com este fungo foi de 70% e a vazão de 180L/h mostrou-se mais adequada à operação do fermentador. A atividade média no reator obtida nestas condições foi de 5,61 U/gss.

No biorreator de vidro, constatou-se que a umidade do meio poroso após a fermentação foi crescente da base para o topo e houve variação longitudinal da atividade enzimática, sendo o maior valor obtido na porção média do biorreator.

As melhores condições de cultivo do fungo termofílico *T. Indicae seudaticae* N31 na escala de sacos foram 50% BC, 25%FT e 25%S, sem a presença de óleo de soja na solução nutriente, com umidade inicial de 70%, 45°C e dois dias de fermentação, para uma atividade enzimática de 2,98 U/gss, resultando em enzimas com baixa atividade hidrolítica. Os resultados na escala de sacos e para os biorreatores de bancada, com ampliação de escala de 10 vezes, foram similares, indicando boa adaptação do fungo às condições de fermentação no biorreator.

O fungo apresenta crescimento rápido, o que aumenta o interesse acerca de sua atividade, apresentando como tempo ótimo de fermentação dois dias.

6.2 Sugestões para trabalhos futuros

Para a continuidade deste trabalho, sugere-se:

- Avaliação detalhada sobre o comportamento metabólico dos fungos e os fatores que influenciam o seu crescimento e a produção de enzima;
- Avaliar a capacidade de melhoramento genético do fungo *T. indicae-seudaticae*, aproveitando seu rápido crescimento para a produção de enzimas mais ativas;
- Avaliação da disponibilidade das fontes de lipídios aos microrganismos, líquidas ou sólidas, e seus efeitos sobre os mecanismos de transferência de calor e massa;
- Aplicação de meios sólidos provenientes de rejeitos industriais, tais como sebo de frigoríficos, para evitar competição entre produção de alimentos e de enzimas;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.K. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines, ***Progress in Energy and Combustion Science***, v.33, p. 233–271, 2007.

ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Editora FEALQ, Piracicaba, 1998, 1163p.

ANTCZAK, M.S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process, ***Renewable Energy***, v.34, p. 1185-1194, 2009.

BADHAN, A.K.; CHADHA, B.S.; KAUR, J.; SAINI, H.S.; BHAT, M.K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp IMI 387099, ***Bioresource Technology***, v. 98, p. 504–510, 2007.

BAHKALI, A.H. Production of cellulase, xylanase and polygalacturonase by *Verticillium tricorpus* on different substrates, ***Bioresource Technology***, v. 51, p. 171–174, 1995.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P.N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview, ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 62, p. 9–14, 2010.

BEYS DA SILVA, W.O.; SANTI, L.; CORRÊA, A.P.F.; SILVA, L.A.D.; BRESCIANI, F.R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle, ***Fungal Biology***, v.114, p.911-916, 2010.

BEYS SILVA, W.O.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, ***Process Biochemistry***, v.40, p. 321–326, 2005.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; DE ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation, ***Process Biochemistry***, v. 42, p. 98–101, 2007.

CASTRO-OCHOA, L .D.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R. O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR 11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 648 - 654, 2005.

COURI, S.; TERZI, S.C.; PINTO, G.A.S.; FREITAS, S.P.; COSTA, A.C.A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8, **Process Biochemistry**, v. 36, p. 255–261, 2000.

DABDOUB, M.J.; BRONZEL, J.L; RAMPIN, M.A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria, **Química Nova**, v. 32, p. 776-792, 2009.

DEIVE, F.J.; CARVALHO, E.; PASTRANA, L.; RUA, M.L.; LONGO, M.A; SANROMAN, M.A. Strategies for improving extracellular lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27, **Bioresouce Technology**, v. 100, p. 3630-3637, 2009.

DEMIRBAS, A. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review, **Applied Energy**, v.86, p.108–117, 2009.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation, **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 113–125, 2003.

FERRAREZI, A. L. **Seleção de fungos termofílicos para produção de lipase e aplicação na produção de biodiesel**. 2011. 169 f. Tese (Doutorado Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

GOG, A.; ROMAM, M.; TOS, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F.D. Biodiesel production using enzymatic transesterification e Current state and perspectives, **Renewable Energy**, v. 39, p. 10-16, 2012.

GOMES, E; UMSZA-GUEZ, M.A.; MARTIN, N.; SILVA, R. Thermostable enzymes: Sources, production and industrial applications - Review, **Química Nova**, v. 30, p. 136-145, 2007.

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

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

JAIN, A. Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus-albomyces* IIS-68, **Process Biochemistry**, v. 30, p. 705-709, 1995.

LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia em fase gasosa**. 1. ed. São Carlos: Acta, 1993.

LAURENTINO, C. L. **Transferência de calor em leito fixos com aplicação em reator de fermentação em estado sólido**. 2007. 105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

KNOTHE, G.; GERPEN, J.V; KRAHL, J. **The Biodiesel Handbook**. 1. ed. Champaing, Aocs Press, 2005.

MARCHETTI, J.M.; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F. Possible methods for biodiesel production, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.11, p. 1300–1311, 2007.

MARTIN, N.; GUEZ, M.A.U.; SETTE, L.D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by a Brazilian thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in solid-state and submerged fermentation, **Microbiology**, v. 79, p. 306-313, 2010.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control, **Biological Control**, v.43, p. 145–155, 2007.

MERHEB-DINI, C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31), **Food Chemistry**, v.120, p. 87–93, 2010.

MITCHELL, D.A.; PANDEY, A.; SANGSURASAK, P.; KRIEGER, N. Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation, **Process Biochemistry**, v.35, p. 167–178, 1999.

MITCHELL, D.A.; CUNHA, L.E.N.; MACHADO, A.V.L.; LUZ JR, L.F.L.; KRIEGER, N. A. model-based investigation of the potential advantages of multi-layer packed beds in solid-state fermentation, **Biochemical Engineering Journal**, v.48, p.195–203, 2010.

PANDEY, A. Solid-state fermentation, **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 81–84, 2003.

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

PRAKASH, G.V.S.B.; PADMAJA, V.; KIRAN, R.R.S. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation, **Bioresource Technology**, v.99, p.1530–1537, 2008.

QUINTELLA, C.M.; TEIXEIRA, L.S.G.; KORN, M.G.A.; NETO, P.R.C.; TORRES, E.A.; CASTRO, M.P.; JESUS C.A. C. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I, **Química Nova**, v.32, p. 793-808, 2009.

RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RANGANATHAN, T.V.; KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentation, **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.127–135, 2003.

ROSATO, Y.B.; MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. Production of Extracellular Enzymes by Isolates of *Metarhizium anisopliae*, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 38, p.1 – 3, 1981.

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

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

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins, **Toxicon**, v.56, p.1267-1274, 2010.

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

SILVA, M.F.; FREIRE, D.M.G.; DE CASTRO, A. M.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, J.V.; TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D. Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 145-152, 2011.

SILVA, W.O.B.; SANTI, L.; BERGER, M.; PINTO, A.F.M.; GUIMARÃES, J.A.; SCHRANK, A.;VAINSTEIN, M.H. Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*, **Process Biochemistry**, v.44, p.829–834, 2009.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13–18, 2009. (substituir RANI)

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

SUAREZ, P.A.Z.; SANTOS, A.L.F.; RODRIGUES, J.P.; ALVES, M.B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los, **Química Nova**, v.32, p. 768-775, 2009.

TAVASSOLI, M.; MALEKIFARD, F.; SOLEIMANZADEH, A.; POURSEYED, A. H.; BERNOUSI, I.; MARDANI, K. Susceptibility of different life stages of *Ornithodoros lahorensis* to entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*, *Parasitol Res*, v. 11, p.1779–1783, 2012.

UMSZA, M. A. **Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em escala de frascos e biorreator de leito fixo.** 2009. 106 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

URIOSTE, D.; CASTRO, M. B. A.; BIAGGIO, F. C.; CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, v. 31, nº 2, p. 407 - 412, 2008.

ZANELATO, A. I. **Produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo**. 2011. 116f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic Conversion of Waste Edible Oil to Biodiesel Fuel in a Fixed-Bed Bioreactor, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.78, p. 703–707, 2001.