

FARELO DE ARROZ COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS

OLIVEIRA, D. S, FERRAZ, L. R.², TREICHEL, H.³, OLIVEIRA, D.⁴

- 1- *Medica Veterinária, Mestre em Ciências Veterinária, Doutora em Engenharia de Alimentos, professora do Instituto de Desenvolvimento do Alto Uruguai-IDEAU.*
- 2- *Mestre em Engenharia de Alimentos, aluna de Doutorado em Engenharia de Alimentos- URI Erechim.*
- 3- *Doutora em Engenharia de Alimentos, professora da Universidade Federal Fronteira Sul- Erechim.*
- 4- *Doutora em Engenharia Química- professora da Faculdade Federal de Santa Catarina.*

Resumo

Dentre as principais enzimas utilizadas em biocatálise destacam-se as lipases, pois apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é restrito. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos e sua quimio, regio e enantiosseletividade. O presente trabalho teve como objetivo geral estudar a otimização do meio de produção de lipase em fermentação em estado sólido por micro-organismos (fungo filamentosso *Penicillium crustosum*) em farelo de arroz como substrato visando à utilização de resíduos agroindustriais para se obter um processo mais econômico e viável e a escolha do melhor suplemento. O fungo filamentosso *Penicillium crustosum* mostrou-se um micro-organismo promissor para produção de lipases utilizando resíduos agroindustriais como substrato. A condição otimizada, de acordo com as variáveis avaliadas, 60 % de umidade e temperatura de 30 °C, conduziu a atividades de esterificação máximas de 136,16 U/g no farelo arroz-FA em 48 horas de fermentação. A partir desses resultados avaliou-se o efeito da suplementação do farelo de arroz para se atingir a maximização da produção de lipase. Através da técnica de planejamento sequencial de experimentos foi possível otimizar o processo em termos de atividade de esterificação para cada substrato testado. A utilização dos resíduos agroindustriais como fontes alternativas de substratos para produção de enzimas podem auxiliar na redução da poluição ambiental, além de reduzir o custo global de produção de enzimas microbianas, levando em conta que o Brasil é um país rico, em se tratando destes resíduos, o que justifica a investigação dos mesmos na obtenção de produtos de alto valor agregado.

PALAVRAS-CHAVE: Lipases, *P. crustosum*, farelo de arroz.

Abstract

Among the major enzymes used in biocatalysis, stand out the lipases, as they present ability to catalyze reactions both in aqueous and organic media. Moreover, the high potential of application of lipases is based on their ability of using a wide range of substrates, their stability to temperature, pH and organic solvents and their chemio, regio and enantioselectivity. The main objective of this work was to evaluate the optimization of medium for the production of lipase by solid state fermentation (SSF) using *Penicillium crustosum* (filamentous fungi) in substrates aiming at the use of agroindustrial residues to obtain an economical and viable process, the choice for the most adequate supplement and the chemical characterization of the enzymatic extract obtained for further application as catalyst in reactions of synthesis. The production of enzymes by SSF by the use of residues and the achievement of high value products justifies this work, considering the increase of volume of agroindustrial residues generated by the industries, associated to the growing concerns about environmental impacts and the stricter legislation. The fungi *Penicillium crustosum* showed a promising potential for lipases production using agroindustrial residues as substrate. The optimized condition, following the evaluated variables, was 60 % of water content and 30 °C, giving maximal esterification activities of 136.16 U/g to rice meal, after 48 hours of fermentation. From these results, the effect of supplementation was evaluated to maximize the lipases production. By means the sequential experimental design technique it was possible to optimize the process in terms of esterification activity for each used substrates: 1.5 wt% of olive oil and 5.5 wt% of urea using soybean bran as substrate and 5.5 wt% of corn steep liquor using rice meal as substrate. The use of agroindustrial residues as alternative sources of substrates for enzymes production can help the reduction of environmental pollution, and also contribute to reduce the global cost of microbial enzymes, taking into account the high volumes of residues produced in Brazil, fact that justifies the investigation of use for the production of high value compounds.

KEYWORDS: Lipases, *P. crustosum*, rice meal.

1- INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática e a biocatálise são ferramentas promissoras para a síntese de compostos de interesse industrial. Dentre as principais enzimas utilizadas em biocatálise destacam-se as lipases, pois apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é restrito. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização em uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos e sua quimio, regio e enantiosseletividade (Hasan *et al.*, 2006, Krieger *et al.*, 2004).

As lipases catalisam uma série de reações, incluindo a hidrólise, interesterificação, alcoólise, acidólise e esterificação. Diante disto, as lipases, especialmente as microbianas, possuem muitas aplicações industriais. Depois das proteases e carboidrases, as lipases são consideradas como o terceiro maior grupo com base no volume total de vendas. Numerosas espécies de bactérias, bolores e leveduras foram encontradas como micro-organismos potenciais para a produção de lipases (Liu *et al.*, 2008^a).

Há um amplo campo de aplicações industriais para lipases, que vem se expandindo nas últimas décadas. Por outro lado, percebe-se uma tendência atual de estudar os processos biotecnológicos de uma forma mais ampla, tentando interrelacionar estratégias e procedimentos adequados, desde as etapas de otimização da produção até a aplicação final da enzima, com o principal intuito de reduzir custos e melhorar a qualidade final do produto (Maldonado *et al.*, 2006).

A fermentação em estado sólido (FES) tem se mostrado como uma alternativa na produção de enzimas microbianas, devido à possibilidade de utilização de resíduos e subprodutos da agroindústria como fonte de nutrientes e suporte para o desenvolvimento do micro-organismo (Castilho *et al.*, 2000; Soccol e Vandenberghe, 2003; Pandey, 2003).

A utilização de co-produtos agroindustriais como matérias-primas na produção de lipases, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado, pode vir a reduzir em muito o preço final da enzima, sendo que a aplicação da fermentação em estado sólido em muitos casos diminui consideravelmente os custos do processo, quando comparada à fermentação submersa (Castilho *et al.*, 2000).

A caracterização dos biocatalisadores produzidos com a determinação dos parâmetros tanto do extrato enzimático bruto como do purificado possibilita a indicação de enzimas nativas em processos catalíticos industriais.

Com base no texto descrito anteriormente, o presente trabalho teve como objetivo estudar a otimização do meio de produção de lipase em fermentação em estado sólido por micro-organismos (fungo filamentoso *Penicillium crustosum*) em farelo de arroz para se obter um processo mais econômico e viável. O aspecto conjunto de produção de enzimas por FES com aproveitamento de resíduos e a geração de produtos de alto valor agregado, justificam plenamente este trabalho, considerando o aumento dos volumes de resíduos agroindustriais gerados nas indústrias, associado à crescente preocupação com os impactos ambientais destes e uma legislação ambiental cada vez mais rígida.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substrato

O substrato utilizado como suporte no processo fermentativo para a produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) foi o farelo de arroz (FA), subproduto do processo de beneficiamento do arroz, obtido em uma indústria de parboilização de arroz (Polisul, Santa Vitória do Palmar, RS). O substrato foi estocado a temperatura de -15 °C com objetivo de manter as características físico-químicas.

2.2 Micro-organismos

O fungo filamentoso *Penicillium crustosum* foi isolado previamente por Rigo *et al.* (2010). Este fungo foi selecionado como potencial produtor de lipases utilizando-se metodologias de seleção em meios sólido e líquido descritos na literatura (Freire, 1996).

2.3 Fermentação em estado sólido (FES)

O farelo, sem prévia classificação, foi utilizado na fermentação conduzida por 120 h em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica, contendo 10 g de farelo seco com umidade ajustada com água destilada. Após esterilização (121 °C, 15 min) os béqueres foram inoculados e incubados em câmara climatizada (Tecnal TE-410). Para

a inoculação do fungo, utilizou-se 2,5 mL de inóculo com concentração de esporos ajustada para se obter $1,0 \cdot 10^8$ esporos/g de farelo seco (Rigo *et al.*, 2010), incubando-se a 30 °C.

Inóculo

O meio para produção do inóculo do fungo constituiu de frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio (PDA). O meio esterilizado foi inoculado com 0,5 mL de suspensão de esporos obtida a partir de estoques, sendo então incubado por 7 dias a 27 °C. A coleta dos esporos foi realizada adicionando-se 10 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1 % v/v) e pérolas de vidro estéreis ao frasco para uma melhor remoção dos mesmos.

A suspensão resultante foi armazenada a 4 °C até sua utilização, por um tempo máximo de 15 dias. Para contagem dos esporos, 1 mL da suspensão era retirado assepticamente e diluído de 10 a 1000 vezes em solução aquosa estéril de Tween 80 (0,1 % v/v). A suspensão resultante foi transferida para câmara de Neubauer (Prolab) para contagem dos esporos. A concentração da suspensão foi ajustada para se alcançar $1,0 \cdot 10^8$ esporos/g de substrato seco (Rigo *et al.*, 2010).

2.4 Estudo da suplementação do farelo utilizado na otimização da produção de lipases a partir do *P. crustosum*

Os suplementos testados foram o óleo de soja (OS), óleo de arroz (OA), azeite de oliva (AO), água de maceração de milho (AMM), melação de cana de açúcar (MC) e uréia (U).

Para a realização das suplementações foram preparadas emulsões com água deionizada e a concentração do respectivo suplemento, homogeneizando-se com mixer por 3 minutos, levando-se em consideração os níveis avaliados no planejamento de experimentos.

O ajuste de umidade foi realizado com água destilada estéril, levando-se em consideração a quantidade de água presente no inóculo e a umidade natural dos farelos brutos. As emulsões foram adicionadas por gotejamento manual com auxílio de pipetador, de forma que toda a área do farelo fosse recoberta, melhorando assim a homogeneidade do meio. A umidade do meio foi ajustada conforme planejamento fatorial. Os béqueres foram então fechados com manta acrílica e autoclavados a 121 °C por 15 min.

Após a esterilização, procedeu-se a inoculação do farelo com uma suspensão de esporos dos micro-organismos, padronizando-se a suspensão em $1,0 \cdot 10^8$ esporos/g farelo seco. Os béqueres foram incubados em câmara a 30 °C, com injeção de ar úmido, de forma a manter a umidade relativa do ar no interior da câmara maior que 90 %.

A avaliação do comportamento cinético da suplementação do farelo na produção de lipase com atividade de esterificação foi realizada por fermentações em triplicata de experimentos, com retirada de amostras destrutivas do material fermentado em intervalos regulares de 48 horas de fermentação na mesma câmara de incubação.

2.5 Cinética da produção de lipase

A primeira etapa realizada neste trabalho consistiu em um ensaio cinético de produção de lipase para cada substrato testado. O *Penicillium crustosum* foi inoculado inicialmente em farelo de arroz, baseando-se nas condições estabelecidas por Vargas *et al.* (2008). A atividade lipásica para cada substrato foi monitorada ao longo de 120 horas de fermentação a 20, 30 e 40 °C. A fermentação foi realizada em duplicata, com béqueres contendo 10g dos respectivos substratos, com umidade de 55 %. Após este ensaio prévio, estudou-se a otimização da produção do farelo de arroz.

2.6 Otimização da produção de lipase

De acordo com os resultados obtidos na cinética da produção, a avaliação da produção de lipase por *P. crustosum* foi realizada em 48 e 72 horas de fermentação para farelo de arroz. A umidade e temperatura da fermentação foram avaliadas como variáveis independentes e a atividade lipásica do extrato enzimático liofilizado, como resposta (variável dependente). Para que as condições de produção de lipases fossem otimizadas, utilizou-se a técnica de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta.

Segundo Rodrigues e Iamma (2005) a técnica de planejamento de experimentos é uma ferramenta estatística que permite determinar os fatores que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, assim como avaliar as possíveis inter-relações entre as variáveis de um processo. Além disso, permite otimizar o sistema em estudo, com o objetivo de maximizar ou minimizar uma determinada resposta.

Após testes preliminares, Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais 2^2 (DCCR), um o substrato, foram realizados variando a umidade (50, 60 e 70 %), do meio fermentativo e a temperatura de incubação em câmara climatizada (20, 30 e 40 °C). Os resultados foram avaliados por meio do software Statistica 5.0 (StatSoft, Inc., 2001).

Após o tratamento estatístico para conhecimento das variáveis que possuem efeito significativo na produção de lipase, partiu-se para suplementação para a otimização da produção de lipases obtidas a partir do *P. crustosum*. Utilizou-se o farelo de arroz com seis suplementos (azeite de oliva (AO), óleo de arroz (OA), óleo de soja (OS), água de maceração de milho (AMM), melado de cana de açúcar (MC) e uréia (U)). Para tal, aplicou-se o planejamento de experimentos do tipo Plackett-Burman (PB) com 15 ensaios, visando uma seleção inicial das variáveis que afetam o processo.

Durante esses novos planejamentos, a umidade foi fixada em 60%, a temperatura em 30 °C e tempo de fermentação em 48 horas.

A análise do planejamento experimental PB indicou a necessidade de novos planejamentos para a otimização da produção de lipases obtidas pelo fungo filamentososo *P. crustosum*. Para o próximo planejamento utilizando farelo de arroz como substrato foi realizado um DCCR com três variáveis independentes (AO, OS e AMM) e com pontos axiais.

Através análise estatística foi possível encontrar as condições otimizadas da produção da enzima a partir do fungo filamentososo *Penicillium crustosum*, no processo de fermentação em estado sólido utilizando farelos de arroz como substrato e diferentes suplementos.

2.7 Processo de extração da enzima

O processo de extração foi realizado em Erlenmeyeres de 250 mL, onde ao meio fermentado foi adicionado tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 na razão 1:5 (10 g de meio fermentado para 50 mL de tampão). Estes frascos foram incubados por 20 min a 35 °C e 200 rpm em agitador orbital. Após a incubação, as amostras foram filtradas, utilizando-se tecido de nylon e pressão manual obtendo-se o extrato enzimático bruto (Vargas *et al.*, 2008).

Cabe ressaltar que a determinação da atividade de esterificação deve ocorrer em sistema com baixo conteúdo de umidade. Assim, foi necessário realizar a desidratação do extrato aquoso obtido após o processo de extração da enzima da matriz sólida. Para tanto, foi empregado o processo de liofilização.

Os extratos foram dispostos em camadas de 1 cm de espessura em placas de Petri e então submetidos ao congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h, como fase preparatória do procedimento de liofilização (Persson *et al.*, 2002). As amostras foram então levadas ao liofilizador, onde através do processo de sublimação em condições de vácuo, a água livre presente no congelado foi removida.

A umidade residual dos extratos liofilizados foi determinada em sistema Karl Fisher, sendo que o teor de água dos extratos enzimáticos não ultrapassou 12 %. As amostras secas foram acondicionadas em frascos de vidro, lacrados, codificados e vedados com Parafilm[®], sendo armazenadas sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o momento de realização das análises.

2.8 Determinação da atividade enzimática de esterificação

A atividade de esterificação do extrato enzimático bruto liofilizado foi quantificada através da reação de síntese do ácido oleico e etanol (razão molar 1:1) (Langone *et al.*, 2002; Bernardes *et al.*, 2007, modificado). A reação foi conduzida a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 160 rpm por 40 min. Esta foi iniciada pela adição do extrato liofilizado (0,1 g) ao meio reacional, em frascos de vidro com tampa, mantidos em agitador orbital. Aliquotas de 500 μL foram retiradas do meio reacional em triplicata no início da reação. A cada amostra foram adicionados 20 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação e para extração do ácido oleico. A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com NaOH 0,035 M. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos na avaliação da cinética observou-se que as atividades de esterificação do *Penicillium crustosum* por FES mais elevadas ocorreram em 48 horas de processo e foi de 112,28 U/g substrato seco (gss) para farelo de arroz, conforme demonstra a Figura 1.

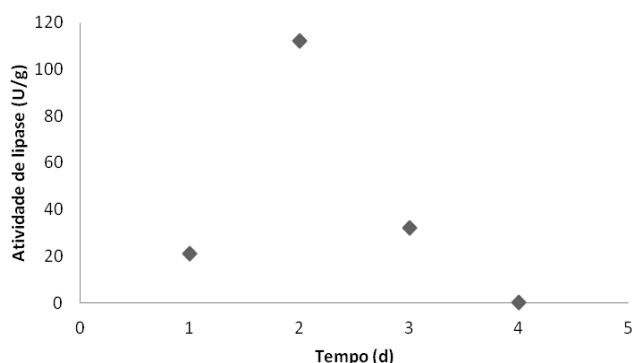


Figura 1- Avaliação da cinética da atividade de lipase em 5 dias, utilizando farelo de arroz como substrato.

Kamini *et al.* (1998), estudando a produção de lipase por cepas de *Aspergillus niger* MTCC 2594 por fermentação em estado sólido usando bagaço de gengerlim encontraram atividade lipolítica de 363,6 U/g de substrato seco em 72 h. Martins *et al.* (2008) encontraram a atividade lipolítica máxima para o fungo *Phialemonium* sp. de 129,50 U/g, utilizando aeração de 60 mL/g.h e óleo de soja como fonte de carbono adicional. Estes mesmos autores encontraram para o fungo *Aspergillus fumigatus* a atividade lipolítica máxima de 119,46 U/g, utilizando aeração de 60 mL/g.h e óleo de soja como fonte de carbono adicional. Kempka *et al.* (2008), investigando a produção lipase por *Penicillium verrucosum*, encontraram uma atividade enzimática de cerca de 40 U/grama de substrato seco. Cabe salientar que todos estes resultados referem-se à atividade de hidrólise do extrato enzimático bruto.

3.1 Otimização da produção da lipase em termos de atividade de esterificação

A partir dos resultados obtidos na etapa de avaliação da cinética da produção, partiu-se para a consecução da otimização do processo em termos de atividade de esterificação em farelo de arroz e o fungo filamentoso *P. crustosum*, utilizando 48 e 72 horas de fermentação em estado sólido.

Pode-se observar que a atividade de esterificação máxima obtida para o substrato testado ocorreu no ponto central (136,16 U/g). Para o farelo de arroz a menor atividade foi observada no ensaio 1 seguida do ensaio 3 (Tabela 1).

Tabela 1- Matriz do DCCR 2² com valores reais e codificados e as respostas da atividade de esterificação com *P. crustosum* em 48 h de FES para farelo de arroz.

Ensaio	Umidade (%)	Temperatura (°C)	FA (U/g)
1	50 (-1)	20 (-1)	63,34
2	70 (1)	20 (-1)	73,15
3	50 (-1)	40 (1)	69,91
4	70 (1)	40 (1)	88,70
5	60 (0)	30 (0)	127,34
6	60 (0)	30 (0)	136,16
7	60 (0)	30 (0)	118,53

Estes resultados podem estar relacionados ao fato de que os micro-organismos tendem a secretar maiores quantidades de enzima nos níveis intermediários de umidade e em temperaturas intermediárias, seguidas das menores. Isso pode ser atribuído à dificuldade de transferência de massa e calor em altos níveis de umidade. O efeito da temperatura na fermentação observado, pode estar relacionado ao fato de que uma maior temperatura ocasiona uma elevada queda de umidade no meio. Como já observado por outros autores, extremos de temperatura e umidade reduzem a produção de lipases (Kamini *et al.*,1998). Rodrigues *et al.* (2008) avaliaram a FES do bagaço de cana de açúcar para produção de lipase em umidade de 75 %. Os autores alcançaram bons resultados de produtividade. Outros trabalhos como o realizado por Godoy *et al.* (2009) indicaram que a produtividade aumenta quando a atividade de água está alta, e diminui quando esta decresce ao longo do processo fermentativo.

A Tabela 2 apresenta a matriz do DCCR 2² com valores reais e codificados e as respostas da atividade de esterificação com *P. crustosum* em 72 h de FES para o farelo de arroz.

Tabela 2- Matriz do DCCR 2² (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de esterificação com *P. crustosum* em 72 h de FES para farelo de arroz

Ensaio	Umidade (%)	Temperatura (°C)	FA (U/g)
1	50 (-1)	20 (-1)	80,78
2	70 (1)	20 (-1)	68,41
3	50 (-1)	40 (1)	52,57
4	70 (1)	40 (1)	138,86
5	60 (0)	30 (0)	151,62
6	60 (0)	30 (0)	130,70
7	60 (0)	30 (0)	172,54

Observa-se que a atividade de esterificação máxima obtida em 72 h também ocorreu no ponto central, mas não houve diferença significativa quando comparado aos outros ensaios, nesse tempo de fermentação. Observa-se que nesse tempo de estudo as atividades de esterificação foram superiores aos valores encontrados em 48 h de fermentação (Tabela 1). Estes resultados assemelham-se aos de Silva (2010), que estudando a otimização do processo de FES com *Penicillium brevicompactum* em torta de babaçu, observou a atividade de esterificação maximizada em 72 horas de fermentação (244,17 U/g), 30 °C, 70 % de umidade e suplementação de 2 % de óleo de soja. Por outro lado, esses resultados diferem dos encontrados por Di Luccio *et al.* (2004) que observou queda na atividade enzimática em 72 h devido à ação proteásica. As menores atividades lipásicas obtidas em 72 h foram de 107,54; 52,57; 60,24 e 58,00 U/g de substrato seco para o FS, FA, FCA e BC, respectivamente.

3.3 Suplementação do farelo de arroz

Após análise estatística foi realizado o estudo da suplementação do farelo de arroz, com seis diferentes suplementos: azeite de oliva (AO), óleo de soja (OS), óleo de arroz (OA), água de maceração de milho (AMM), melaço (MC) e uréia (U). A literatura relata que a suplementação do meio com lipídios em alguns casos não é eficiente. Ao adicionar outras fontes de carbono complementares, pode ocorrer a redução da produção devido à repressão catabólica pela fonte de carbono disponível no meio de cultura (Kamini *et al.*, 1998).

Farelo de arroz como substrato

O Brasil é um grande produtor de arroz, sendo a região Sul o principal produtor de arroz do país. O farelo de arroz é um co-produto e é usado principalmente como alimentação animal, pois possui algumas enzimas que acidificam o óleo. Por este motivo, somente uma quantidade pequena do óleo é transformada em óleo comestível (<10%) (Magalhães *et al.*, 2006).

O farelo de arroz contém cerca de 87 % de matéria seca, 11 a 15 % de proteína bruta, 15 a 20% de lipídios e cinzas 6,5 %-10 % (Juliano e Bechtel, 1994). O teor de gordura é caracterizado por uma composição de ácidos graxos de 34-37 % oléico, 36-42 % linoléico, 21-23 % palmítico, 1,7 % esteárico e 1,2 % linolênico (Campos *et al.*, 2007). Este substrato também contém proteínas com um bom equilíbrio de aminoácidos para os animais monogástricos. O baixo preço do farelo de arroz permite a redução do custo final da ração de suínos e aves, mas pode também ser utilizado como uma fonte de baixo custo para a produção de enzimas, como lipases.

Através de dados obtidos na concepção do experimento, observou-se que a maior AE da lipase foi encontrada no ensaio 4 (161,88 U/g de substrato seco), onde o farelo de arroz foi suplementado com 1 % (p/) AO, 1 % (p/) OA, 4 % (p/p) AMM e 2 % (p/p) de U, seguida do ensaio 5 (141,36 U/g de substrato seco) onde foram usados 1 % (p/p) AO, 1 % (p/p) OS, 4 % (p/p) AMM e 4 % (p/p) MC, estes valores foram superiores aos encontrados quando se estudou a atividade de esterificação em 48 h do farelo puro, mostrando que a suplementação foi necessária para se atingir a maximização da atividade.

Fontes de carbono e de nitrogênio para a produção da lipase de *Bacillus cereus* foram amido e sulfato de amônio (nível de nitrogênio 21,2 mg/100 mL), peptona (nível de nitrogênio 297 mg/100 mL), e uréia (nível de nitrogênio 46,62 mg/100 mL) em associação, respectivamente (Dutta e Ray, 2009). Quando *Penicillium citrinum* foi cultivado em meio simples (1,0 % do azeite e 0,5 % de extrato de levedura), utilizando óleo de oliva como fonte de carbono no inóculo, a enzima extraída mostrou atividade máxima. Além disso, a diminuição da concentração de extrato de levedura também reduz a atividade (Pimentel *et al.*, 1994).

Ferraz *et al.* (2010^a), estudando a produção de lipase por *Penicillium crustosum* em FES e utilizando como substrato o farelo de arroz, encontraram atividade de esterificação de

112,28 U/g de substrato seco (gss) e Kempka *et al.* (2008), investigando a produção de lipase por *Penicillium verrucosum*, encontraram cerca de 40U/g de substrato seco.

Os suplementos utilizados no farelo de arroz que apresentaram resultados positivos com 90 % de significância foram azeite de oliva, óleo de soja e água de maceração de milho. O óleo de arroz não apresentou efeito significativo. Este fato provavelmente se dá devido a sua composição, pois pode ter levado a um excesso de nutrientes ao micro-organismo, causando um efeito inibitório. O melaço apresentou efeito significativo negativo. Os resultados referentes à análise estatística dos dados obtidos no experimento anterior estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Efeito das variáveis de processo, estudadas no planejamento experimental Plackett-Burman (PB) na produção de lipase após 48h de fermentação no farelo de arroz

	Efeito	Desvio	t(2)	p
Média	73,91	4,27	17,30	0,003
(1) AO	32,29*	9,55	3,38	0,077
(2) OS	48,17*	9,55	5,04	0,037
(3) OA	10,10	9,55	1,05	0,400
(4) AMM	47,74*	9,55	4,99	0,037
(5) MC	-42,17*	9,55	-4,41	0,047
(6) U	10,43	9,55	1,09	0,388

*Efeitos significativos $p < 0,1$.

Martins *et al.* (2008) utilizaram como substrato o farelo de arroz e a casca de arroz em FES junto com 1 % de óleo de soja como suplemento e encontraram uma atividade máxima de produção de lipase para o fungo *Phialemonium* de 129,5 U/g de substrato seco e para o fungo *Aspergillus fumigatus* de 119,40 U/g de substrato seco. Quando Alkan *et al.* (2006) pesquisaram a produção de lipase por *Bacillus coagulans* em FES utilizando resíduos sólidos de melão, encontraram atividade de 78,069 U/g em 24 h de fermentação suplementada com 1 % de azeite de oliva.

A produção de lipase é influenciada pelo conteúdo de carbono no meio quando este é de origem lipídica (Mahadik *et al.*, 2002). Segundo alguns trabalhos publicados, este

comportamento está diretamente relacionado ao mecanismo de regulação do micro-organismo em estudo. Assim, alguns casos relatam que a suplementação do meio com lipídios não é eficiente (Kamini *et al.*, 1998).

Para o farelo de arroz observou-se que o azeite de oliva, óleo de soja e água de maceração de milho apresentaram efeito significativo positivo quando utilizados como suplementos na produção de lipase.

3.4 Maximização da produção de lipase com o uso de suplementos

Com objetivo de se atingir a maximização da produção de lipase através da suplementação do farelo de arroz, foi realizado um DCCR 2³ (azeite de oliva, óleo de soja e água de maceração de milho), com as variáveis que apresentaram efeito estatisticamente significativo ($p < 0,1$).

A mais alta atividade foi obtida com 0,4 % (p/p) de AO, 2,6 % (p/p) de OS e 2,3 % (p/p) de AMM (140,03 U/g) e a mais baixa atividade foi de 12,57 U/g quando se adicionou 1,5 % (p/p) de AO, 3 % (p/p) OS e 5,5 % (p/p) de AMM, provavelmente levando a um excesso de lipídios ao substrato. Estes resultados são superiores aos encontrados por os autores citados abaixo.

O bagaço de cana suplementado com azeite de oliva resultou em eficiente produção de lipase por *Rhizopus rhizopodiformes* e *Rhizomucor pusillus*, obtendo-se atividades de 79,60 e 20,24 U/g com o uso de precursores adequados (Cordova *et al.*, 1998).

A produção de lipase em FES com *Aspergillus niger* 11T53A14, utilizando farelo de trigo indicou a suplementação do meio com resíduo de refinaria de milho, como promissor indutor, resultando em atividade lipásica de 60 U/g (Damaso *et al.*, 2008).

A condição otimizada para a produção de lipase e esterase descritas por Silva (2010^a) foi em meio contendo óleo de soja 2% m/m, umidade 70%, temperatura 30°C, tanto para o farelo de mamona como para a torta de babaçu.

A Tabela 4 apresenta os coeficientes de regressão para a produção de lipase após 48 h de fermentação em estado sólido (FES) utilizando farelo de arroz como substrato suplementado com azeite de oliva, óleo de soja e água de maceração de milho.

Tabela 4- Coeficientes de regressão para a produção de lipase após 48 h de FES utilizando farelo de arroz como substrato e diferentes suplementos

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(7)	p
Média	64,80	14,13	4,58	0,002
(1) AO (L)	-15,53	6,64	-2,33	0,05
AO (Q)	11,50	7,31	1,57	0,15
(2) OS (L)	-16,30	6,64	-2,45	0,04
OS (Q)	-2,309	7,31	-0,31	0,76
(3) AMM (L)	-9,15	6,64	-1,37	0,21
AMM (Q)	19,00	7,31	2,59	0,03
1L by 2L	-18,14	8,67	-2,09	0,07
1L by 3L	2,49	8,67	0,28	0,78
2L by 3L	-14,72	8,67	-1,69	0,13

Através da Tabela 4 foi possível obter o modelo empírico para a atividade lipásica em função do AO, OS e AMM em 48 h de FES, utilizando farelo de arroz como substrato. O modelo codificado otimizado para 48 horas pode ser visualizado na Equação 1 para a atividade lipásica e foi validado pela análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 5.

$$AEFA = 64,80 - 15,53.AO + 11,50.AO^2 - 16,30.OS - 2,30.OS^2 - 9,15.AMM + 19,00.AMM^2 - 18,14.AO.OS + 2,49.AO.AMM - 14,72.OS.AMM$$

Equação 1

Onde:

AEFA= Atividade de esterificação em 48h de fermentação com farelo de arroz (FA);

AO= Azeite de oliva;

OS= Óleo soja;

AMM=Água de maceração de milho.

Observa-se que o coeficiente de correlação obtido (0,90) e o valor de F calculado (3,33) maior que o F tabelado (2,72), permiti a validação do modelo matemático com 90 % de confiança.

Tabela 5- Análise de variância para atividade lipásica no tempo de 48 h utilizando FA como substrato e diferentes suplementos

Fontes de variação	SQ	GL	SQM	F Calculado
Regressão	18080,72	9	2008,96	3,33
Resíduos	4212,23	7	601,74	
Total	22292,95	16		

Coeficiente de correlação: $R=0,90$ $F_{tab,90\%} = 2,72$

De acordo com a análise estatística observa-se que somente a AMM apresentou efeito significativo ($p<0,1$) positivo quando suplementado no farelo de arroz. O OS e o AO apresentaram efeito significativo negativo ($p<0,1$) indicando que esses óleos poderiam estar causando inibição por excesso de substrato para o micro-organismo, reduzindo assim a atividade de esterificação da enzima.

Com base nos resultados obtidos a partir de análise estatística foi realizado um novo teste somente utilizando a suplementação do farelo de arroz com 5,5 % (p/p) de AMM para se obter a otimização da produção de lipase em processo de FES em 48 h utilizando o fungo filamentosso *Penicillium crustosum*, conforme mostra a Tabela 6.

Tabela 6- Suplementação do farelo de arroz com AMM com triplicata do ponto central

Ensaio	AMM	AE
---------------	------------	-----------

	(%p/p)	(U/g)
1	5,5	98,65
2	5,5	90,42
3	5,5	94,54

Através de análises estatísticas e dos resultados demonstrados na Tabela 6 pode-se verificar a otimização da produção de lipase utilizando farelo de arroz como substrato suplementado com AMM (5,5 % p/p) e o fungo *Penicillium crustosum*. Cabe salientar que a AMM é um excelente suplemento de baixo custo, pois é um subproduto obtido a partir da extração do milho, reduzindo assim os custos finais para a produção de enzimas, além de contribuir para a redução de poluentes ambientais. Resultados opostos ao do experimento foram encontrados por Rigo *et al.* (2010). Estes autores verificaram que a adição de 1 % (m/v) dos suplementos ao farelo de soja não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a produtividade obtida em 48 h de fermentação com farelo de soja em suplemento e a obtida em meio contendo Os e AMM.

4.0 CONCLUSÕES

O fungo filamentosso *Penicillium crustosum* mostrou-se um micro-organismo promissor para produção de lipases utilizando farelo de arroz como substrato.

Na cinética de avaliação para a produção lipásica, observou-se que a maior atividade de esterificação foi de 112,28 (em 48 h) U/g de substrato seco para farelo de de arroz. Após a avaliação estudou-se a otimização do processo de produção da lipase em termos de atividade de esterificação, utilizando quatro diferentes substratos (farelo de soja, de arroz, de caroço de algodão e bagaço de cana), verificando o efeito de duas variáveis (umidade e temperatura) para cada substrato. A condição otimizada, de acordo com as variáveis avaliadas, 60 % de umidade e temperatura de 30°C, conduziu a atividades máximas 136,16 U/g. Em 72 horas de fermentação, atividades de 172,54 U/g foram obtidas. Através da técnica de planejamento seqüencial de experimentos foi possível otimizar o processo em Termos de atividade de esterificação para cada substrato testado: 1,5 % (p/p) de azeite de oliva e 5,5 % (p/p) de uréia no farelo de soja e 5,5 % (p/p) de AMM no farelo de arroz.

5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alkan H, Baysal Z, Uyar F, Dogru M.; **Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006:136,183-192.

Bernardes O.L., Bevilaqua J.V., Leal M.C.M.R., Freire, D.M.G., Lagnone, M.A.P.; **Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2007:136-140, 105-114.

Campos R.L.M, Hierro E., Ordoñez J.A., Bertol T.M., Terra N.N, L. de la Hoz; **Fatty acid and volatile compounds from salami manufactured with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract and pork back fat and meat from pigs fed on diets with partial replacement of maize with rice bran**. Food Chemistry, 2007:103, 1159–1167.

Castilho L.R., Polato C.M.S., Buarque E.A., Sant'Anna Jr. G.L., Freire D.M.G.; **Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state submerged fermentations**. Biochemical Engineering Journal, 2000:4, 239-247.

Cordova J., Nemmaoui M., Ismaïli-Alaoui M., Morin A., Roussos S., Raimbault M., Benjlali B.; **Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 1998:5, 75-78.

Damaso M.C.T., Passianoto M.A., Freitas S.C., Freire DMG., Lago R.C.A., Couri S.; **Utilization of Agroindustrial Residues for Lipase production by Solid-State Fermentation**. Brazilian Journal of Microbiology, 2008:39, 676-681.

Di Luccio M., Capra F., Ribeiro N.P., Vargas G.D.L.P., Freire D.M.G., Oliveira D.; **Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum***. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004:113-116, 173-180.

Dutta S, Ray L.; **Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C(7)**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009.

Ferraz L.R., Oliveira D.S, Silva M.F., Treichel H., Oliveira D.; **Produção de lipase microbiana por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais**. 3º Simpósio de Segurança Alimentar. Anais 3º Simpósio de Segurança Alimentar, Florianópolis, 2010^(a).

Freire D.M.G.; **Seleção de micro-organismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum***. Rio de Janeiro: 1996. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica, IQ/UFRJ.

Godoy M.G., Gutarra M.L.E., Maciel F.M., Felix S.P., Bevilaqua J.B., Machado O.L.T., Freire D.M.G.; **Use of a low-cost methodology for biodegradation of castor bean waste and lipase production**, *Enzyme and Microbial Technology*, 2009:44, 317-322.

Hasan F., Shah A.A., Hamee A.; **Industrial applications of microbial lipases**. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006:39, 235-251.

Juliano B. O., Bechtel, D. B.; **The rice grain and its gross composition**. In *Rice chemistry and technology*, St. Paul, Minnesota, USA: The American Association of Cereal Chemists, 1994, 17-57.

Kamini N.R., Mala J.G.S., Puvanakrishnan R.; **Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake**. *Process biochemistry*, 1998: 33,505-511.

Kempka A.P., Lipke N.L., Pinheiro T.L.F., Menoncin S., Treichel H., Freire D.M.G., Di Luccio M., Oliveira D.; **Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation**. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2008:31, 119-125.

Krieger N., Taipa M.A., Melo E.H.M., Lima J.L., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S.; **Purification of *Penicillium citrinum* lipase by chromatographic processes**. *Bioprocess Engineering*, 2004:20, 59-65.

Langone M.A., De Abreu M.E., Rezende M.J., Sant'Anna Jr. G.L.; **Enzymatic synthesis of medium chain monoglycerides in a solvent-free system**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002:100, 987-996.

Liu X.; Piao X.; Wang Y.; Zhu S.; He, H.; **Calcium methoxide as a solid base catalyst for the transesterification of soybean oil to biodiesel with methanol**, 2008^a:87, 1076-1082.

Magalhães T.O., Fernandes J. A., Corso T., Einloft S, Dullius J., Ligabue R.; **Complexos de estanho como catalisadores na produção de biodiesel obtido a partir do óleo do farelo de arroz**. 17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2006: Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

Mahadik N.D., Puntambekar U.S., Bastawde K.B., Khire J.M., Gokhale D.V.; **Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation.** Process Biochemistry, 2002:38, 715-721.

Maldonado R.R., Burkert J.F.M., Maugeri F., Rodrigues M.I.; **Estudo da produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 em frascos agitados utilizando meios industriais,** in VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa, 2006:121.

Martins V.G., Kalil S.J., Costa J.V.; **Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos.** Química Nova, 2008:31, 1942-1947.

Pandey A.; **Solid-state fermentation.** Biochemical Engineering Journal, 2003:13, 81-84.

Persson M., Mladenoska I., Wehtje E., Patrick Adlercreutz P.; **Preparation of lipases for use in organic solvents.** Enzyme and Microbial Technology, 2002:31, 833–841.

Pimentel M.C, Krieger N, Coelho LC, Fontana JO, Melo EH, LedinghamWM, et al.; **Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*.** Applied Biochemistry and Biotechnology, 1994; 49, 59–74.

Rigo E., Ninow J. L., Di Luccio M., Oliveira, V.Polloni A. E., Remonato D., Arbter F., Vardanega R., Oliveira D., Treichel H.; **Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements.** Food Science and Technology, 2010:43, 1132-1137.

Rodrigues M.I., Iemma A.F.; **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos, Uma estratégia sequencial de planejamentos,** 2005, 325p.

Rodrigues D. S., Cavalcante G. P., Silva G. F., Ferreira A. L. O., Gonçalves L. R. B.; **Effect of additives on the esterification activity of immobilized *Candida antarctica* lipase.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008:24, 833–839.

Silva M. F.; **Produção e caracterização parcial de lipases de *penicillium verrucosum* e *penicillium brevicompactum* utilizando como substratos torta de babaçu e farelo de mamona.** 2010. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil.

Silva M.F., Freire D.M.G., Castro A.M., Di Luccio M., Mazutti M.A., Oliveira J.V., Treichel H., Oliveira D. **Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and**

Penicillium brevicompactum under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2011^a: 34, 145–152.

Socol C.R., Vandenberghe L.P.S.; **Overview of applied solid-state fermentation in Brazil.** *Biochemical Engineering Journal*, 2003:13, 205-218.

Vargas G.D.L.P., Treichel H., Oliveira D., Beneti S.C., Freire D.M.G., Di Luccio M.; Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2008:83, 47-54.