

**Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Engenharia
Departamento de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química**

**Otimização da Produção de Lipase e Celulase por Fermentação
Submersa Utilizando a Torta da Polpa e Fungos Isolados do
Fruto da Macaúba (*Acrocomia aculeata*).**

Camila Sales Nascimento

Orientadora: Prof.a. Dr^a Maria Helena Caño Andrade

Co-orientadora: Prof.a. Dr^a Vera Lúcia dos Santos

Belo Horizonte

2015

Camila Sales Nascimento

Otimização da Produção de Lipase e Celulase por Fermentação Submersa utilizando a Torta da Polpa e Fungos Isolados do Fruto da Macaúba (*Acrocomia aculeata*).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais como um dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dr^a Maria Helena Caño Andrade

Co-orientadora: Profa. Dr^a Vera Lúcia dos Santos

Belo Horizonte

2015

“Renda-se como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece, como eu mergulhei. Pergunte, sem querer, a resposta, como estou perguntando. Não se preocupe em ‘entender’. Viver ultrapassa todo o entendimento”. Clarice Lispector

Agradecimentos

A Deus por estar sempre presente na minha vida, e tornar tudo possível;

Ao meu pai, Cloves, ausente materialmente, mas pela força do amor, presente constantemente em minha vida;

A minha mãe Rosane, pelo amor, apoio e exemplo constante; pelos momentos de plenitude e apoio familiar incondicionais. A você, minha eterna gratidão;

Aos meus irmãos Renato e Rodrigo pelo amor, incentivo e pela presença sempre constante em minha vida;

A minha tia e madrinha Erika, pelo amor, apoio e por me ajudar em tantos momentos da minha vida;

Ao Thiago, pelo amor, carinho e suporte, por sempre estar presente na minha vida, me ajudando em todas as decisões;

A Minha Orientadora Dr^a Maria Helena, pela oportunidade, credibilidade, apoio e orientação;

A minha Co-orientadora Dr^a Vera Lúcia, pela oportunidade, pelos ensinamentos científicos, pela compreensão e motivação que tanto me ajudaram durante o mestrado;

Ao Professor Dr^o Roberto Quinino, pois foi através da sua colaboração que conseguimos realizar parte importante deste trabalho;

Ao Jamil, pela ajuda nas análises de HPLC e por todo apoio durante a execução deste trabalho;

Aos Amigos do Laboratório de Processos e Produtos da Macaúba- DEQ- UFMG;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia aplicada ICB-UFMG;

As minhas amigas Babi e Rebs, que me aguentaram em todas as fases durante o Mestrado;

A Regiane, minha dupla imbatível para todas as horas!

Aos meus amigos de todas as horas;

Ao Departamento de Pós graduação em Engenharia Química;

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada!

Resumo

A investigação sobre a seleção de substratos adequados para o processo fermentativo tem principalmente sido focada em resíduos agroindustriais, devido às suas vantagens potenciais. A utilização deles como matéria-prima para produção de enzimas tornou-se viável devido ao seu baixo custo econômico, sua alta disponibilidade e resolução de problemas relacionados a poluição. Assim, o presente trabalho teve como enfoque principal, estudar e otimizar a produção das enzimas lipases e celulases por fungos filamentosos isolados do fruto da Macaúba (*Acrocomia aculeata*), por processo de fermentação submersa, utilizando como substrato a torta residual do processo de extração do óleo da polpa da Macaúba. Dezenove fungos filamentosos isolados do fruto foram avaliados quantitativamente quanto à capacidade de produção de lipase, celulase e protease. *Fusarium proliferatum* M62, *Fusarium* sp. M184 e *Fusarium* sp. M233 *Cladosporium cladosporonoides* M19, *Fusarium proliferatum* M62, *Penicillium* sp. M89, *Fusarium* sp. M184 e *Fusarium* sp. M233 foram positivos para atividade lipolítica, celulásica e proteolítica. Posteriormente, foi realizado um Delineamento Fatorial de Níveis Mistos L12 para o isolado *Penicillium* sp. M89, os resultados indicaram que as variáveis, concentração da torta de Macaúba e o tipo da fonte de nitrogênio, influenciaram significativamente na atividade lipolítica, enquanto que a variável temperatura influenciou na atividade celulásica. Em seguida, no Delineamento Composto Central Rotacionado, os resultados permitiram estipular as condições ótimas de produção simultânea das duas enzimas testadas. Para a produção das enzimas em UmL^{-1} a melhor condição foi de 3,5% de torta de Macaúba e 33,7°C. Para a atividade enzimática em Umg^{-1} de proteína total (atividade específica) a melhor condição foi 2,5% de torta de Macaúba e 34,4°C, enquanto para a atividade enzimática em Ug^{-1} de biomassa, a condição ótima foi de 2,5% e 40°C. A otimização resultou em um aumento na produção das enzimas, respectivamente, abrindo perspectivas para a otimização do processo de fermentação utilizando a torta de Macaúba para produção de hidrolases por processos de baixo custo.

Palavras-chave: Lipase; celulase; Macaúba; *Penicillium* sp. M89; fermentação submersa; protease.

Abstract

Research into the selection of suitable substrates for the fermentation process has mainly been focused on agro-industrial waste, because to its potential advantages. Use them as raw material for the production of enzymes it has become viable because of its low cost, its high availability and resolution of related pollution problems. Thus, this work had as focus, study the production of enzymes lipases and cellulases by filamentous fungi isolated from the fruit of Macaúba (*Acrocomia aculeata*) by submerged fermentation process, using as substrate cake residual from oil extraction process of the pulp Macaúba. Nineteen filamentous fungal isolates of the fruit have been evaluated quantitatively for the production capacity of lipase, cellulase and protease. *Fusarium proliferatum* M62, *Fusarium* sp. M184, *Fusarium* sp. M233, *Cladosporium cladosporonoides* M19, *Fusarium proliferatum* M62, *Penicillium* sp. M89, *Fusarium* sp. M184 and *Fusarium* sp. M233 were positive for lipase, cellulase and protease activity. The isolate *Penicillium* sp. M89 has been the best simultaneously lipase and cellulase producer, following with the optimization tests of fermentation medium containing Macaúba cake. First, was performed a Factorial Design of Mixed Levels L12, the results indicated that the variables, Macaúba cake concentrations and type of nitrogen source, significantly influenced ($\alpha < 0.05$) the lipolytic activity, while the temperature variable influenced ($\alpha < 0.05$) the cellulase activity. Next, in the Rotational Central Composite Design, the results have allowed stipulate the optimal conditions of simultaneous production of the two enzymes tested. Results allowed to stipulate the optimal conditions of simultaneous activity of the two enzymes tested, for the activity of enzymes in U mL^{-1} , the best condition was 3.5% Macaúba cake and 33.7°C. For the enzymatic activity U mg^{-1} , the best condition was 2.5% Macaúba cake and 34.4°C temperature and for the enzymatic activity in U g^{-1} optimal conditions was 2.5% Macaúba cake and 40°C. The optimization resulted in activity increasement of enzymes. The research conducted generated perspectives of new studies associated to the use of Macaúba cake for production hydrolases by low cost processes.

Keywords: Lipase; cellulase; Macaúba; *Penicillium* sp M89; submerged fermentation; protease.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE TABELAS	XVIII
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Enzimas.....	5
3.1.1 Lipases.....	7
3.1.1.1 Estrutura.....	10
3.1.1.2 Fontes e Propriedades	13
3.1.1.3 Aplicações Biotecnológicas das Lipases	15
3.1.2 Celulases.....	17
3.1.2.1 Estrutura.....	19
3.1.2.2 Fontes e Propriedades	19
3.1.2.3 Aplicações Biotecnológicas.....	21
3.1.3 Proteases.....	22
3.1.3.1 Estrutura.....	22
3.1.3.2 Fontes e propriedades	23
3.1.3.3 Apilcaoes biotecnológicas	24
3.2 Processos Fermentativos para Produção Enzimática.....	25
3.2.1 Fermentação Submersa para a Produção de Lipase por Fungos.....	27
3.2.2 Fermentação Submersa para a Produção de Celulase por Fungos	28
3.3 Aproveitamento de Coprodutos da Extração do Óleo na Produção de Enzimas.....	30
3.4 Macaúba.....	31
3.4.1 O Óleo do Fruto	34
3.4.2 Torta da Polpa da Macaúba	35
4 METODOLOGIA.....	38

4.1 Metodologia Esquemática.....	38
4.2 Local.....	41
4.3 Microrganismos Produtores de Enzimas	41
4.4 Manutenção dos Microrganismos Fúngicos	42
4.5 Ensaio Qualitativo: <i>Screening</i> para Atividade Enzimática.....	42
4.5.1 Preparo do Inóculo.....	42
4.5.1.1 <i>Screening</i> para a Produção de Lipase	43
4.5.1.2 <i>Screening</i> para a Produção de Celulase	43
4.5.1.3 <i>Screening</i> para a Produção de Protease	43
4.6 Ensaio Quantitativo: Produção de Enzimas.....	44
4.6.1 Produção de Lipase.....	44
4.6.2 Produção de Celulase.....	44
4.6.3 Produção de Protease.....	45
4.7 Atividade Enzimática.....	46
4.7.1 Determinação da Atividade Lipolítica.....	46
4.7.2 Determinação da Atividade Celulolítica.....	47
4.7.3 Determinação da Atividade Proteolítica	48
4.8 Obtenção e Preparo da Torta da Polpa da Macaúba	49
4.8.1 Caracterização Química da Torta da Polpa da Macaúba	50
4.8.1.1 Teor de Umidade e Voláteis	50
4.8.1.2 Teor de Óleo.....	50
4.8.1.3 Teor de Acidez da Polpa.....	51
4.8.1.4 Proteínas.....	52
4.8.1.5 Carboidratos Totais, Hemicelulose e Celulose.....	52
4.8.1.6 Lignina.....	53
4.9 Ensaio Preliminares para a Otimização da Fermentação	54
4.9.1.1 Influência da Concentração do Óleo da Macaúba na Produção de Lipase.....	54
4.9.1.2 Influência da Concentração da Torta da Macaúba na Produção de Lipase, Celulase e Protease.....	54
4.10 Otimização da Fermentação	55
4.10.1 Delineamento Fatorial Fracionado Misto L12.....	55

4.10.2 Delineamento Composto Central Rotacionado	57
4.10.2.1 Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford	60
4.10.2.2 Avaliação do Crescimento pela Dosagem de Ergosterol Associado a Biomassa Fúngica.....	60
4.11 Caracterização Bioquímica e Cinética das lipases e celulasas produzidas	61
4.11.1 Caracterização da Atividade Lipolítica do Extrato Bruto Frente a Diferentes p-fenil Ésteres de Ácidos Graxos	61
4.11.2 Caracterização da Atividade Enzimática do Extrato Bruto Frente a Diferentes Temperaturas.....	62
4.11.3 Caracterização da Atividade Enzimática do Extrato Bruto Frente a Diferentes Valores de pH.....	62
4.12 Estatística.....	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1 Caracterização do Potencial de Produção de Enzimas Hidrolíticas	64
5.1.1 Atividade da Lipase em Óleo de Oliva pelo Método Quantitativo	65
5.1.2 Atividade de Lipase em Óleo de Macaúba pelo Método Quantitativo.....	67
5.1.3 Atividade Celulásica pelo Ensaio Quantitativo	70
5.1.4 Atividade Proteolítica pelo Ensaio Quantitativo	71
5.2 Ensaio de Fermentação	74
5.2.1 Caracterização Química das Tortas	74
5.2.2 Ensaio Preliminares de Otimização da Produção de Lipases e Celulasas por Isolados Fúngicos em Fermentação Submersa Usando como Fonte de Carbono a Torta de Macaúba.....	76
5.2.2.1 Influência da Concentração do Óleo da Macaúba na Produção de Lipase.....	76
5.2.2.2 Influência da Concentração da Torta da Macaúba na Produção de Lipase	80
5.2.2.3 Influência da Concentração da Torta da Macaúba na Produção de Celulase	83
5.2.2.4 Influência da Concentração da Torta da Macaúba na Produção de Protease	86
5.2.2.5 Relação da Atividade Proteolítica e Atividade Lipásica e Celulásica	89
5.2.3 Otimização da Fermentação	90
5.2.3.1 Delineamento Fatorial Fracionado de Níveis Mistos L12 para Seleção de Variáveis Significativas sobre a Atividade das Lipases e Celulasas pelo isolado Penicillium M89....	90

5.2.3.2 Delineamento Composto Central Rotacionado	100
5.3 Caracterização Bioquímica e Cinética das Enzimas.....	113
5.3.1 Caracterização da Atividade Lipolítica do Extrato Bruto Frente a Diferentes P-fenil Ésteres de Ácidos Graxos.	113
5.3.2 Caracterização da Atividade Enzimática do Extrato Bruto Frente a Diferentes Temperaturas.....	114
5.3.3 Caracterização da Atividade Enzimática do Extrato Bruto Frente a Diferentes Valores de pH.....	116
6 CONCLUSÕES	119
7 REEFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
8 ANEXO	142

LISTA DE ABREVIATURAS

‰: percentual (massa / volume)

ANOVA: Análise de variância

aw: Atividade de água

BDA: Agar Dextrose Batata

CMC: carboximetilcelulose

DCCR: delineamento composto central rotacional

DNS: ácido 3,5 – dinitrosalicílico

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima)

FES: Fermentação em estado sólido

FSb: Fermentação submersa

g: grama

h: hora

HPLC: high performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência).

kDa: quilodaltons

Kg: Quilogramas

L: litro

M: metros

mg: miligramas

min :minuto

mL: mililitro

mm: milímetros

mol: $6,023 \cdot 10^{23}$ unidades

nm: nanômetros

°C: graus célsius

p/v: massa por volume

p: p-value

PA: Padrão Analítico

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

pNP: paranitrofenol
pNPP: p-nitrofenil palmitato
ppm: concentração em partes por milhão
rpm: rotações por minuto
U: Atividade enzimática
UV: ultravioleta
YCB: Carbono Levedura Base
YM: Meio de extrato de levedura e malte
YNB: Nitrogênio Levedura Base
 α : alfa
 β : beta
 λ : comprimento de onda
 μL : microlitros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Reações catalisadas por lipases	9
Figura 2- Modelo estrutural de α/β hidrolases.....	11
Figura 3- Posicionamento da estrutura secundária que compõe a tampa na ativação da lipase. (Fonte: GOMIDE, 2012).	12
Figura 4- Mecanismo de ativação interfacial na presença de uma interface hidrofóbica.....	13
Figura 5- Aplicações industriais das lipases.....	16
Figura 6- Atuação das enzimas da celulase sobre a estrutura da celulose.....	18
Figura 7- Palmeira Macaúba	32
Figura 8- Fruto da palmeira Macaúba.	32
Figura 9- Fruto da Macaúba	33
Figura 10: Metodologia para seleção de microrganismos produtores de lipase e celulase	39
Figura 11: Metodologia para a otimização do processo de produção simultânea das enzimas lipase e celulase	40
Figura 12- Reação de hidrólise do 4-nitrofenil palmitato (pNPP). Uma molécula pNPP tem sua ligação éster hidrolisada, gerando ácido palmítico e pNP, cuja absorção é lida em 410nm.	46
Figura 13- Polpa e Torta de Macaúba	50
Figura 14- Halos formados pela degradação das enzimas nos respectivos substratos [a) lipase; b) celulase; c) protease].	65
Figura 15- Atividade lipolítica de acordo com o tempo de cultivo em meio mineral suplementado com óleo de Oliva 1%. *Letras iguais em um mesmo tempo avaliado significam que não houve diferença estatística entre as médias. Letras diferentes significam que ocorreu diferença significativa ao nível de 5%. Legenda: ■ <i>F. proliferatum</i> M62; ■ <i>Fusarium</i> sp. M184; ▨ <i>Fusarium</i> sp. M233.	66
Figura 16- Atividade lipolítica de acordo com o tempo de cultivo em meio mineral suplementado com óleo de Macaúba 1%. *Letras iguais em um mesmo tempo significam que não houve diferença estatística entre as médias. Letras diferentes significam que ocorreu	

diferença significativa ao nível de 5%. Legenda: ■ *C. cladosporonoides* M19; ■ *F. proliferatum* M62; ■ *Penicillium* sp. M89; ■ *Fusarium* sp. M184; ■ *Fusarium* sp. M233. 68

Figura 17- Atividade celulase de acordo com o tempo de cultivo em meio mineral suplementado com carboximetilcelulose 1%. *Letras iguais em um mesmo tempo significam que não houve diferença estatística entre as médias. Letras diferentes significam que ocorreu diferença significativa ao nível de 5%. Legenda: ■ *C. cladosporonoides* M19; ■ *F. proliferatum* M62; ■ *Penicillium* sp. M89; ■ *Fusarium* sp. M184; ■ *Fusarium* sp. M233. 70

Figura 18- Atividade proteolítica de acordo com o tempo de cultivo em meio YCB suplementado com caseína 0,01% como fonte de carbono. *Letras iguais em um mesmo tempo significam que não houve diferença estatística entre as médias. Letras diferentes significam que ocorreu diferença significativa ao nível de 5%. Legend: ■ *C. cladosporonoides* M19; ■ *F. proliferatum* M62; ■ *Penicillium* sp. M89; ■ *Fusarium* sp. M184; ■ *Fusarium* sp. M233. 72

Figura 19- Efeito da concentração do óleo de Macaúba na produção de lipase de acordo com o tempo pelos isolados *C. cladosporonoides* M19 (a), *F. proliferatum* M62 (b), *Penicillium* sp. M89 (c), *Fusarium* sp. M184 (d) e *Fusarium* sp. M233 (e). * Letras maiúsculas comparam médias do tempo de cultivo dentro de um mesmo isolado; letras minúsculas comparam médias da concentração do óleo dentro de cada tempo de cultivo de cada isolado. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, $p < 0,05$). Legenda: ■ 0,75%; ■ 1,5%; ■ 3% de óleo de Macaúba. 78

Figura 20- Efeito da concentração da torta de Macaúba na produção de lipase de acordo com o tempo, pelos isolados *F. proliferatum* M62 (a), *Penicillium* sp. M89 (b), *Fusarium* sp. M184 (c) e *Fusarium* sp. M233 (d). * Letras maiúsculas comparam médias do tempo de cultivo dentro de um mesmo isolado; letras minúsculas comparam médias da concentração da torta dentro de cada tempo de cultivo de cada isolado. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente (Tukey, $p < 0,05$). Legenda: ■ 1,75%; ■ 3,75%; ■ 7,5%; ■ 15% de torta de Macaúba. 81

Figura 21- Efeito da concentração da torta de Macaúba na produção de celulase de acordo com o tempo, pelos isolados *C. cladosporonoides* M19 (a), *F. proliferatum* M62 (b),

Penicillium sp. M89 (c), *Fusarium* sp. M184 (d) e *Fusarium* sp. M233 (e). * Letras maiúsculas comparam médias do tempo de cultivo dentro de um mesmo isolado; letras minúsculas comparam médias da concentração da torta dentro de cada tempo de cultivo de cada isolado. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente (Tukey, $p < 0,05$). Legenda: ■ 1,75%; ▨ 3,75%; ▩ 7,5%; ■ 15% de torta de Macaúba. 84

Figura 22- Efeito da concentração da torta de Macaúba na produção de protease de acordo com o tempo, pelos isolados *C. cladosporonoides* M19 (a), *F. proliferatum* M62 (b), *Penicillium* sp. M89 (c), *Fusarium* sp. M184 (d) e *Fusarium* sp. M233 (e). * Letras maiúsculas comparam médias do tempo de cultivo dentro de um mesmo isolado; letras minúsculas comparam médias da concentração da torta dentro de cada tempo de cultivo de cada isolado. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente (Tukey, $p < 0,05$). Legenda: ■ 1,75%; ▨ 3,75%; ▩ 7,5%; ■ 15% de torta de Macaúba. 88

Figura 23- Variação da atividade da lipase microbiana em relação ao tratamento e tempo de cultivo. 92

Figura 24- Variação da atividade da celulase microbiana em relação ao tratamento e o tempo de cultivo. 93

Figura 25- Gráficos de efeitos principais sobre a resposta atividade lipolítica após cultivo de *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa. 96

Figura 26- Gráficos de efeitos principais sobre a resposta atividade celulásica após cultivo de *Penicillium* sp. M89, em fermentação submersa. 97

Figura 27- Condições de otimização para produção de celulase e lipase ajustada pelo modelo, após fermentação submersa por *Penicillium* sp. M89. *T= Temperatura; %F.C= porcentagem da fonte de carbono; % F.N= porcentagem da fonte de nitrogênio; F.N= Fonte de nitrogênio. 99

Figura 28- Gráficos de superfície de resposta dos efeitos combinados da concentração de fonte de carbono e da temperatura sobre a atividade lipolítica $U mL^{-1}$, $U mg^{-1}$ e $U g^{-1}$ ajustada, após cultivo de *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa. 107

Figura 29- Gráfico de superfície de resposta dos efeitos combinados da concentração de fonte de carbono e da temperatura sobre a atividade celulásica $U mL^{-1}$, $U mg^{-1}$ e $U g^{-1}$ ajustada, após cultivo de *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa. 108

Figura 30- Condições de otimização para atividade lipolítica e celulasíca UmL ⁻¹ ajustada pelo modelo, após cultivo de <i>Penicillium</i> sp. M89 em fermentação submersa....	109
Figura 31- Condições de otimização para atividade lipolítica e celulasíca Umg ⁻¹ ajustada pelo modelo, após cultivo de <i>Penicillium</i> sp. M89 em fermentação submersa....	109
Figura 32- Condições de otimização para atividade lipolítica e celulasíca Umg ⁻¹ ajustada pelo modelo, após cultivo de <i>Penicillium</i> sp. M89 em fermentação submersa....	110
Figura 33- Gráfico de superfície de resposta dos efeitos combinados da concentração de fonte de carbono e da temperatura sobre o crescimento celular (mg.g ⁻¹) ajustado, após cultivo de <i>Penicillium</i> sp. M89 em fermentação submersa.	111
Figura 34- Condições de otimização para o crescimento celular (mg.g ⁻¹) ajustado pelo modelo, após cultivo de <i>Penicillium</i> sp. M89 em fermentação submersa.....	111
Figura 35- Temperatura ótima de atuação da lipase produzida pelo isolado <i>Penicillium</i> sp. M89. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente no nível de significância de 5% para o teste de comparação de médias de Tukey.	115
Figura 36 - Temperatura ótima de atuação da celulase produzida pelo isolado <i>Penicillium</i> sp. M89. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente no nível de significância de 5% para o teste de comparação de médias de Tukey.	116
Figura 37- pH ótimo de atuação da lipase produzida pelo isolado <i>Penicillium</i> sp. M89. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente no nível de significância de 5% para o teste de comparação de médias de Tukey.	117
Figura 38 - pH ótimo de atuação da celulase produzida pelo isolado <i>Penicillium</i> sp. M89. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente no nível de significância de 5% para o teste de comparação de médias de Tukey.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aplicações industriais das enzimas obtidas de plantas, animais e microrganismos.	25
Tabela 2: Composição em % ácidos graxos dos óleos da polpa e da amêndoa da Macaúba.....	34
Tabela 3: Composição centesimal da torta de Macaúba.....	36
Tabela 4: Microrganismos Isolados do fruto da Macaúba.....	41
Tabela 5: Valores não codificados dos níveis de cada fator avaliado no delineamento fatorial misto L12.	56
Tabela 6: Valores codificados dos níveis de cada fator avaliado no delineamento fatorial misto fracionado L12.	57
Tabela 7: Valores não codificados dos níveis de cada fator avaliado no DCCR. ...	58
Tabela 8: Valores codificados dos níveis de cada fator avaliado no DCCR	59
Tabela 9: Produção de lipase, celulase e protease por fungos filamentosos isolados de frutos da palmeira Macaúba evidenciada nos ensaios qualitativos.....	64
Tabela 10: Composição química da torta de Macaúba.....	74
Tabela 11: Coeficiente de Pearson da correlação entre a produção de protease e lipase em diferentes concentrações da torta de Macaúba de acordo com o tempo de cultivo.	89
Tabela 12: Fatores e respostas do delineamento fatorial fracionado misto relacionadas atividade de lipase e celulase por <i>Penicillium</i> sp. M89 em fermentação submersa, em 12 dias de cultivo.	94
Tabela 13: Análise de variância para a resposta, produção de lipase por fermentação submersa pelo isolado <i>Penicillium</i> sp. M89 segundo delineamento fatorial fracionado misto, em 12 dias de cultivo.	95
Tabela 14: Análise de variância para a resposta, produção de celulase por fermentação submersa pelo isolado <i>Penicillium</i> sp M89 segundo delineamento fatorial fracionado misto, em 12 dias de cultivo.	97
Tabela 15: Fatores (valores reais) e respostas do DCCR, com seis repetições no ponto central relacionadas à atividade da lipase por <i>Penicillium</i> sp. M89 em fermentação submersa.	101

Tabela 16: Fatores (valores reais) e respostas do DCCR, com seis repetições no ponto central relacionadas à atividade de celulase por <i>Penicillium</i> sp. M89 em fermentação submersa.	102
Tabela 17: Fatores (valores reais) e respostas do DCCR, com seis repetições no ponto central relacionadas à atividade de celulase por <i>Penicillium</i> sp. M89 em fermentação submersa.	103
Tabela 18: Modelos preditivos com coeficientes não codificados que descrevem produção de lipase e celulase por <i>Penicillium</i> sp. M89 em fermentação submersa.	104
Tabela 19: Modelos preditivos com coeficientes codificados que descrevem produção de lipase e celulase por <i>Penicillium</i> sp. M89 em fermentação submersa.	105
Tabela 20: Especificidade da lipase do isolado <i>Penicillium</i> sp. M89 quanto ao tipo de substrato, empregando-se ésteres de p-nitrofenil de tamanho da cadeia carbônica entre C2-C16.	113

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) é uma palmeira frutífera, nativa de florestas tropicais e com ampla distribuição geográfica. Essa espécie apresenta ampla utilidade e, mais recentemente, seu fruto tem despertado grande interesse econômico por sua capacidade de produção de óleo vegetal, sendo que a Macaúba possui potencial para ser uma das principais fontes desse óleo no Brasil (NUCCI, 2007). Em meio as suas várias utilidades são relatados usos medicinais, alimentícios, cosméticos, produção de energia, outros. Esses usos proporcionam um suporte para a rentabilidade da utilidade atualmente destacada como a mais promissora, que é o potencial de produção de óleo vegetal por hectare de plantios racionais e de programas de melhoramento (NUCCI, 2007).

No entanto, a crescente produção nacional e mundial de óleos vegetais, impactará expressivamente na geração de resíduos agroindustriais, em especial as tortas residuais produzidas a partir da extração de óleos de biomassas oleaginosas. Segundo estimativa da Organização de Agricultura e a Alimentação das Nações Unidas (FAO), no período de 2012 a 2014, a produção mundial de torta residual de culturas oleaginosas aumentou de 111,3 para 126,9 milhões de toneladas (2014). Um dado relatado na literatura indica que a quantidade de resíduos gerados na cultura do coco da Macaúba para extração de óleos gira em torno de 14,5 t/ha.ano (SILVA; BARRICHELO; BRITO, 1986), sendo necessário oferecer um destino adequado e rentável para estes resíduos. Uma possibilidade inovadora reside no emprego dessas tortas como substratos em bioprocessos.

Adicionalmente, deve-se destacar que com a implementação de leis e políticas ambientais cada vez mais restritivas, tem sido observada uma tendência pelas indústrias de substituição dos processos químicos baseados em insumos não renováveis por processos químicos ou bioquímicos que utilizem insumos renováveis (POLITZER e BON, 2006). Como consequência, tem crescido o número de desenvolvimentos de novos processos, que possam resultar em produtos com maior qualidade, redução dos custos de produção e diminuição do consumo energético.

Devido a grande quantidade de nutrientes disponíveis na torta da Macaúba, esta pode ser convertida em produtos comerciais ou matérias-primas para processos tecnológicos. Entre as tecnologias, pode-se citar a produção de moléculas com alto valor agregado, como

proteínas microbianas, os ácidos orgânicos, biocombustíveis como o etanol e biodiesel, as enzimas e os metabólitos secundários biologicamente ativos (ALEXANDRINO *et al.*, 2007).

Entre os diversos insumos produzidos a partir de técnicas de conversão biológica com a utilização de resíduos agroindustriais, a produção de enzimas tem sido cada vez mais estudada devido a sua aplicabilidade em diferentes setores industriais.

As enzimas são biocatalisadores eficientes quando comparados aos catalisadores convencionais, uma vez que apresentam especificidade ao substrato minimizando a formação de produtos secundários, reduzem o custo energético, pois atuam em condições brandas de processo e, adicionalmente, são biodegradáveis.

A produção de enzimas por processos fermentativos submersos utilizando fungos filamentosos tem se destacado, devido a facilidade de cultivo destes microrganismos, pela alta eficiência na secreção de enzimas para o meio extracelular e, ainda, pela capacidade de utilizarem os resíduos ou coprodutos produzidos pela agroindústria como substrato para crescimento. É interessante ressaltar que as condições ou os parâmetros dos processos de fermentação, tais como, temperatura, pH, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, microrganismo utilizado, taxas de aeração e agitação, e outros são importantes fatores que devem ser avaliados nos processos de produção da enzima em processos fermentativos submersos.

Entre as diversas enzimas que podem ser obtidas através de processos fermentativos, encontram-se as lipases e celulasas microbianas, a pesquisa básica dessas moléculas de alto valor agregado, além gerar conhecimento científico, apresentam um reconhecido potencial biotecnológico. Tais enzimas têm sido comumente utilizadas em diversos setores industriais como nas indústrias têxteis, de papel, de alimentos e bebidas, e ração animal. Outro potencial de aplicação, que vem crescendo rapidamente e impulsionando pesquisas relacionadas à produção de biodiesel e etanol de 2ª geração é o uso de enzimas como biocatalisadores. Dessa forma, considerando a grande biodiversidade existente, a procura por novas cepas de microrganismos produtores de enzimas lipolíticas e celulolíticas, com melhores características fisiológicas em relação à fermentação do substrato, resistência e adaptabilidade à toxicidade de substratos de baixo custo, às condições de temperatura, ao pH e outros, ainda é necessária.

Assim, o desenvolvimento de estudos de novas linhagens de microrganismos e fontes de carbono alternativas para fermentação, como os resíduos agroindustriais, podem levar a uma produção de enzimas mais eficaz e com menores custos, além de valorizar e propiciar um destino adequado para o resíduo. Dentro desse contexto, este trabalho teve como enfoque principal, estudar e otimizar a produção das enzimas lipases e celulasas por fungos filamentosos isolados do fruto da Macaúba, em processo de fermentação submersa, utilizando como substrato a torta residual do processo de extração do óleo da polpa da Macaúba. É importante destacar que este trabalho contribui cientificamente para as pesquisas, ainda escassas, relacionadas à utilização deste coproduto como substrato na fermentação submersa para produção de enzimas lipolíticas e celulásicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar e otimizar produção de lipases e celulasas por fungos filamentosos isolados da casca e polpa de frutos da Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.), através de fermentação submersa (FSb), utilizando como substrato a torta resultante do processo de extração mecânica dos óleos da polpa do fruto da Macaúba.

2.2 Objetivos Específicos

Para o alcance do objetivo global, destacam-se o alcance dos seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o potencial de dezenove fungos filamentosos previamente isolados da casca e da polpa de frutos da Macaúba para a produção de lipases, celulasas e proteases por métodos qualitativos e quantitativos;
- Avaliar a atividade da enzima lipase em meios de culturas contendo óleo da polpa de Macaúba em diferentes concentrações, como substrato para a fermentação de isolados selecionados como potencialmente produtores de lipases;
- Avaliar a atividade das enzimas lipase, celulase e protease em meios de culturas contendo torta da polpa em diferentes concentrações, como substrato para a fermentação de isolados selecionados como potencialmente produtores de lipases e celulasas;
- Selecionar uma cepa fúngica potencialmente produtora das enzimas lipase e celulase;
- Caracterizar a torta de Macaúba quanto ao teor de umidade, lipídeos, acidez, proteínas, carboidratos totais, hemicelulose, lignina e celulose;
- Otimizar as condições de cultivo do processo de FSb para a produção de lipases e celulasas, variando-se os parâmetros físico-químicos: pH e temperatura; e nutricionais: concentração da fonte de carbono (torta da polpa) e fonte de nitrogênio: extrato de levedura, nitrato de amônio e ureia;
- Caracterizar o extrato enzimático bruto produzido durante a fermentação nas condições de temperatura e pH ótimos do processo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Enzimas

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadoras biológicas de reações químicas, que agem impulsionando o processo de transformação do substrato em produtos desejados, sendo extremamente específicas para as reações que catalisam. Destaca-se que o tipo de enzima encontrado em uma célula determina o tipo de metabolismo anabólico ou catabólico, bem como os substratos utilizados pelas mesmas como fonte de carbono e de energia (PROZYN INDÚSTRIA e COMÉRCIO, 2012).

Enzimas são heteropolímeros de estrutura molecular complexa, constituída principalmente por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas, (HARTMEIER, 1988; ORLANDELLI e FELBER, 2012). Podem ser divididas em seis classes, segundo as reações químicas que catalisam: oxidoredutases - catalisam reações de óxido-reduções; transferases - catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra; hidrolases - catalisam reações de hidrólise; liases - catalisam reações de quebra de ligações; isomerases - catalisam reações de mudança intramolecular, onde um substrato é convertido em seu isômero; e ligases - catalisam a ligação covalente de moléculas, com quebra simultânea de uma ligação de alta energia. (LIMA *et al.*, 2001; ORLANDELLI e FELBER, 2012).

Grande parte das proteínas sintetizadas na célula são enzimas, referidas como enzimas intracelulares, citoplasmáticas, que somente podem ser obtidas por rompimento da célula. Há microrganismos que também têm a capacidade de sintetizar enzimas que são excretadas para fora da célula, podendo ser encontradas no meio de cultivo ou de propagação celular, sendo mais facilmente isoladas e avaliadas e são chamadas de enzimas extracelulares (KIELING, 2002). Quase todas as enzimas preparadas em escala industrial até hoje são extracelulares, pois seu isolamento dos meios ou caldos de cultivo é geralmente mais simples, embora se encontrem diluídas nestes meios, o que pode tornar seu isolamento muito dispendioso (KIELING, 2002). As técnicas desenvolvidas para a purificação de biomoléculas dependem da natureza e das características das amostras, assim como o grau de pureza desejado no final do produto (KULA; KRONER; HUSTEDT, 1982). A precipitação de proteínas mediante a adição de reagentes ou de soluções constitui uma técnica simples e

rápida para a concentração de proteínas (TEOTIA; KHARE; GUPTA, 2001), sendo muito empregada em indústrias como fase inicial do processo de purificação, pois reduz em grande parte o volume reacional para estágios posteriores (GLATZ, 1998).

. Existem diversos métodos utilizados para a separação de proteínas. LEHNINGER (1993) classifica os métodos da seguinte forma:

a) Processos de separação baseados em peso molecular: diálise e ultrafiltração; centrifugação em gradiente de densidade; cromatografia de exclusão molecular;

b) Processos de separação baseados nas diferenças de solubilidade: precipitação isoeétrica; solubilização e/ou precipitação das proteínas por salificação (*salting-in* e *salting-out*); fracionamento por solventes;

c) Processos de separação baseados na carga elétrica da molécula;

d) Separação de proteínas por adsorção seletiva;

e) Separações baseadas na especificidade de ligantes: cromatografia por afinidade.

As enzimas são essenciais para a maquinaria metabólica de todos os organismos vivos, pois atuam como biocatalisadores e realizam reações bioquímicas específicas que integram os processos metabólicos das próprias células. Também, desempenham importante papel na degradação da matéria orgânica e, portanto, na ciclagem de nutrientes nos ambientes naturais. (BEG *et al.*, 2001; KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002). Para Bon e Pereira Jr. (1999), as enzimas têm sua utilização em vários setores industriais, como as indústrias de alimentos, detergentes, couro, celulose e papel, medicamento e setor têxtil. É vantajoso usar enzimas na indústria, porque são naturais, não tóxicas e específicas para determinadas ações. Além disso, são capazes de alterar as características de variados tipos de resíduos, contribuindo para reduzir a poluição ambiental (MUSSATO, FERNANDES, MILAGRES, 2007). São consideradas bastante ativas e versáteis por executarem uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido e em condições brandas de reação. Ainda, não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH; características que as tornam altamente desejáveis para uso como catalisadores. Adicionalmente, em geral, os processos industriais que empregam enzimas são relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e requerem investimentos de baixo custo (PATEL, 2002; PIZARRO e PARK, 2003; COLEN, 2006).

Em biotecnologia, as enzimas são de extrema importância e a maioria delas provém de microrganismos. O mercado mundial de enzimas é grande, e inclui enzimas produzidas por microrganismos que foram selecionados na natureza ou modificados geneticamente para uma produção mais eficiente e para atuarem em processos passíveis de serem conduzidos em temperaturas mais elevadas ou em outras condições de estresse (SERAFINI *et al.*, 2001). As principais enzimas de aplicação industrial são proteases, amilases, lipases, celulases, xilanases e fitases, (MUSSATTO, FERNANDES e MILAGRES, 2007).

Atualmente, a tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais biocatalisados apresentam menor consumo energético e menor impacto ambiental, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e por serem altamente específicas, minimizam efeitos indesejáveis. No entanto, o desenvolvimento de processos de produção de enzimas em escala industrial, com qualidade e custos que permitam sua comercialização em larga escala, requer um trabalho laborioso, caro e interdisciplinar. Faz-se necessário o conhecimento técnico-econômico da relação entre linhagem, o meio de produção, o processo de fermentação, os métodos de recuperação e a demanda de mercado (BON, 2002; MITIDIERI *et al.*, 2002).

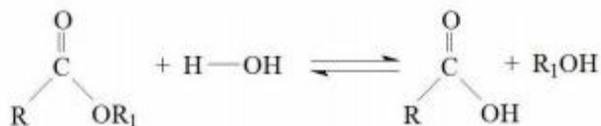
Uma das estratégias de impacto para diminuir o custo de produção de enzimas é o uso de substratos baseados em resíduos agroindustriais. Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes materiais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como enzimas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (SANCHÉS, 2009).

3.1.1 *Lipases*

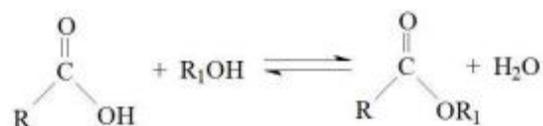
As lipases são hidrolases de triacilglicerídeos classificadas pela *Enzyme Commission* (E.C) como 3.1.1.3. São enzimas que catalisam a hidrólise das ligações ésteres presentes nas moléculas de triacilgliceróis, liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (JAEGER *et al.*, 1993). Além das reações da hidrólise, as lipases são capazes de realizar reações de aminólise (síntese de amidas) e lactonização e, também, podem atuar como catalisadores em reações de esterificação ou transesterificação (alcoólises, acidólises e interesterificação) quando a quantidade de água do sistema em que estão

presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese (Figura 1). (KRISHNA e KARANTH, 2001; GOTOR *et al.*, 2002; GHANEM e ABOUL-ENEIN, 2004; RASSY *et al.*, 2004)

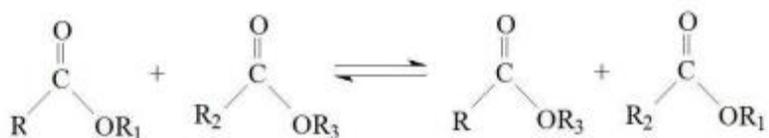
Hidrólise



Esterificação



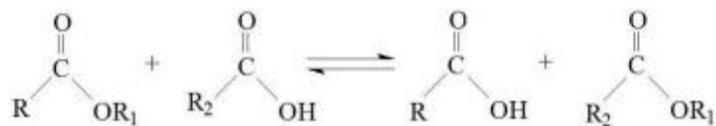
Interesterificação



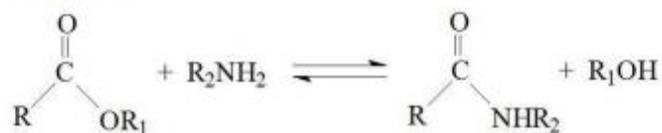
Alcoólise



Acidólise



Aminólise



Lactonização

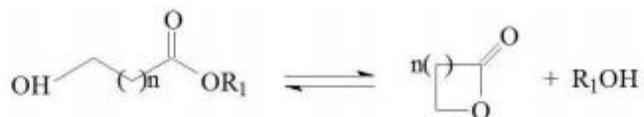


Figura 1-Reações catalisadas por lipases
(Fonte: Adaptado de Parques e Macedo, 2005).

De maneira geral, as lipases não requerem cofatores, atuam em ampla faixa de pH, e são estáveis a altas temperaturas (VILLENEUVE *et al.*, 2000; HASAN *et al.*, 2006). As lipases são enzimas que exibem propriedades de quimiosseletivas, regioseletivas e enantioseletivas, cuja especificidade é controlada pelas propriedades da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação da enzima ao substrato, sendo o triacilglicerídeo seu substrato padrão (GUPTA, GUPTA e RATHI, 2004; KAPOOR, GUPTA, 2012). Nesse contexto, a quimiosseletividade, a regioseletividade e a enantioseletividade de muitas lipases permitem que essas enzimas catalisem uma ampla variedade de reações orgânicas com mínimo de subprodutos, baixo custo de tratamento operacional e condições brandas de temperatura e pressão. Estas características tornam as lipases altamente aplicáveis em processos industriais (GUPTA, R.; GUPTA, N., RATHI, 2004; VILLENEUVE *et al.* 2000).

A diferenciação entre lipases e esterases é feita considerando a especificidade preferencial das duas enzimas. Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações éster tríplices, enquanto esterases atuam sobre ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar (BIER, 1955; BROCKMAN, 1984). A maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (JAEGER *et al.*, 1999).

3.1.1.1 Estrutura

A estrutura da lipase foi identificada através de técnicas de cristalografia realizadas na presença de meios aquosos homogêneos. A estrutura terciária de todas as lipases descritas, tanto de eucariotos quanto procariotos, é do tipo α/β hidrolase (SCHRAG e CYGLER, 1997) (Figura 2). Este tipo de estrutura apresenta um núcleo central composto por fitas β paralelas rodeadas por porções em α -hélice. As fitas β têm orientação para a esquerda, sendo que a primeira e a última fita possuem um ângulo de aproximadamente 90° entre si (VÉLEZ ESCALLÓN, 2009).

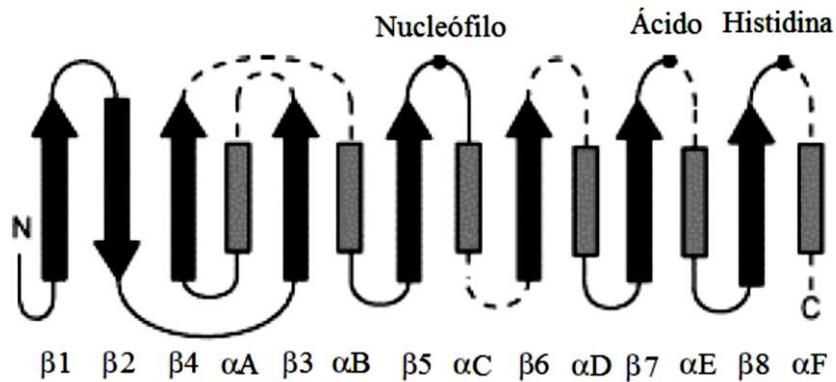


Figura 2- Modelo estrutural de α/β hidrolases.

(Fonte: Pouderoyen *et al.*, 2001).

O sítio catalítico é formado pela tríade catalítica composta pela sequência G – X1 – S – X2 – G, onde G = Glicina; S = Serina; X1 = Histidina e X2 = aspartato ou glutamato, que se repete em todas as lipases, sendo esta tríade frequentemente protegida na molécula por uma “tampa” hidrofóbica ou “*lid*”, e devido à presença do *lid*, a lipase pode se apresentar em duas diferentes conformações, fechada ou aberta conforme Figura 3. (BRADY *et al.*, 1990; REIS *et al.*, 2009).

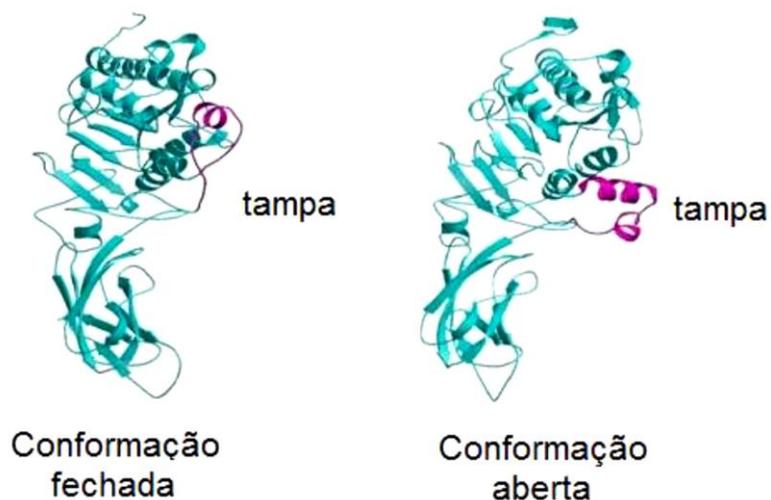


Figura 3- Posicionamento da estrutura secundária que compõe a tampa na ativação da lipase. (Fonte: GOMIDE, 2012).

Na primeira conformação, o sítio ativo da enzima está fechado pela tampa polipeptídica que isola o sítio ativo do meio de reação (nesta conformação a lipase é considerada inativa). Na segunda conformação, a enzima torna-se ativa em contato com uma interface hidrofóbica, ocorrendo a abertura da tampa polipeptídica (BRADY *et al.*, 1990; REIS *et al.*, 2009). A determinação da estrutura tridimensional de lipases dos fungos *Rhizomucor miehei*, *Geotrichum candidum* e lipase pancreática humana por difração de raios-X possibilitou uma explicação para o fenômeno de ativação interfacial, onde a tampa hidrofóbica sofre uma mudança conformacional na presença de uma interface lipídio/água, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, expondo o sítio ativo, agora acessível ao substrato conforme apresentado na Figura 4. (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004; PAQUES e MACEDO, 2006).

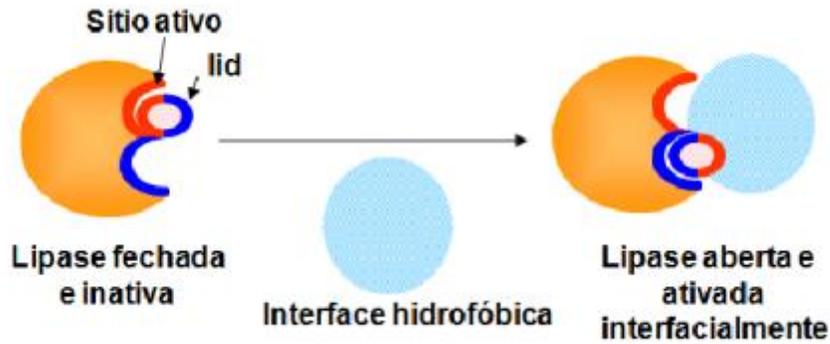


Figura 4- Mecanismo de ativação interfacial na presença de uma interface hidrofóbica.

Fonte: (RODRIGUES, 2009)

Essas enzimas em geral são solúveis, atuam nas interfaces entre as fases aquosas e oleosas e mostram a mais alta atividade, quando a concentração do substrato oleoso é suficiente para formar micelas ou gotas em emulsão (REIS *et al.*, 2009).

A capacidade de ativação interfacial é uma das características mais marcantes das lipases, que possibilita distingui-las das esterases (ERICKSSON *et al.*, 2008). Mas existem divergências na interpretação quanto à exclusividade dessa característica para classificar o grupo (BON *et al.*, 2008).

3.1.1.2 Fontes e Propriedades

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (YANG *et al.*, 2005). As lipases provenientes de microrganismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, principalmente pela versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação catalítica e especificidade ao substrato e estabilidade, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (FEITOSA e FELBER, 2010). Além disso, as enzimas produzidas por microrganismos permitem maior facilidade na manipulação, rapidez e controle das condições de cultivo, acarretando em um custo mais baixo, enquanto o custo do isolamento para lipases a partir de fontes animais e plantas é bem oneroso (BON *et al.* 2008; DALLA-VECCHIA *et al.* 2004).

O número de microrganismos classificados como produtores de lipases representa apenas um pequeno percentual da biodiversidade dos microrganismos que potencialmente podem produzir enzimas, e que ainda não foram caracterizados (aproximadamente 0,2 a 0,6% para bactérias e de 5% para fungos). Esta grande abundância de microrganismos existentes na natureza torna importante o “*screening*” e o isolamento de novas cepas produtoras de enzimas com características desejáveis em biocatálise (WUBBOLTS *et al.*, 2000).

Há uma diversidade de lipases que vem sendo produzidas por cultura submersa ou métodos de fermentação no estado sólido usando várias espécies de microrganismos, tais como as lipases fúngicas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, *Mucor javanicus*, leveduras como *Candida rugosa*, *Candida Antarctica*, *Mucor miehei*, *Tulopsis* sp, e lipases bacterianas como as *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia glumae* e *Pseudomonas fluorescens* (DALLA-VECCHIA *et al.* 2004). Dentre os microrganismos, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas que produzem normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação e, ainda, a maioria dos fungos não são nocivos à saúde humana sendo reconhecidos como GRAS “Generally Regarded as Safe” (OLEMSKA-BEER *et al.*, 2006). Por outro lado, o baixo crescimento celular dos fungos em relação às fontes bacterianas produtoras destas enzimas é uma das desvantagens dos processos fermentativos (JAEGER *et al.*, 1999).

A produção de lipases por microrganismos como fungos é determinada por variáveis nutricionais e físico-químicas como temperatura, pH, fontes de carbono e nitrogênio e presença de lipídeos, sais inorgânicos, agitação e concentração de oxigênio dissolvido, (SINGH *et al.*, 2012). A metodologia mais empregada para se sintetizar a enzima por microrganismos é a fermentação submersa, sendo que os métodos de fermentação em estado sólido são a segunda opção (SHARMA *et al.*, 2001).

Muitas das propriedades das lipases podem variar de acordo com o gênero e espécie, o que torna difícil o estabelecimento de uma padronização nas metodologias. Como relatado por Castro e colaboradores (2004), conforme a fonte, as lipases podem possuir massa molecular que varia entre 20 e 75 kDa, pH ótimo de atividade numa faixa de 4 a 9 e atuar em uma temperatura de até 70°C. Contudo, a maioria das lipases microbianas mostram atividade ótima entre pH 7-9 e temperatura ótima entre 30-40°C (BORNSCHEUER *et al.* 2002).

3.1.1.3 Aplicações Biotecnológicas das Lipases

As lipases, como biocatalisadores, apresentam importantes vantagens sobre os catalisadores clássicos industriais. As características de especificidade, regioseletividade e enantioseletividade, permitem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Além disso, os processos enzimáticos evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluente; são mais econômicos; apresentam maior facilidade de manuseio; requerem temperatura e pressão ambientes, condições estas que minimizam a degradação de compostos lábeis (CASTRO-OCHOA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Essa versatilidade das lipases permite que estas enzimas sejam empregadas em diversos setores da indústria na formulação de detergentes, produção de fármacos, cosméticos, alimentos, perfumaria, diagnósticos médicos, síntese de compostos opticamente ativos, produção de aromas e fragrâncias e modificações de óleos e gorduras (SHARMA, 2001). Uma síntese do uso das lipases na indústria pode ser visualizada na Figura 5.

Setor	Efeito Utilizado	Produto
Alimentício		
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos lácteos
Panificação	Melhoramento do sabor/qualidade, prolongamento do tempo de prateleira	Confeitos de bolos
Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídios	Bebidas Alcoólicas, ex: saque, vinho e outras
Processamento de derivados do ovo	Melhoramento da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos	Maionese, molhos e cremes
Processamento de carne e peixe	Desenvolvimento de aroma e remoção de excesso de gorduras	Produtos embutidos
Processamento de carne e peixe	Transesterificação de óleos naturais	Óleos e gorduras modificadas (substitutos da manteiga de cacau)
Processamento de óleos	Hidrólise de óleos (ácidos graxos), diglicerídeos e monoglicerídeos)	
Químico		
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
Detergentes	Remoção de manchas de óleo e gorduras	Detergentes
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos
Analítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico
Cosmético	Remoção de lipídeos	Cosméticos em geral
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais	Produtos de couro
Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpeza de tubulação, tratamento de efluentes e outros, em combinação com outras enzimas

Figura 5- Aplicações industriais das lipases

Fonte: Adaptação de Sharma, 2001.

3.1.2 Celulases

A capacidade dos microrganismos de assimilar matéria orgânica depende da sua habilidade em produzir as enzimas necessárias para a degradação do substrato (TUOMELA *et al.*, 2000). Microrganismos capazes de degradar celulose produzem uma gama de enzimas com diferentes especificidades, que trabalham em conjunto, conhecidas como celulases.

Celulases são enzimas que hidrolisam as ligações do tipo β -1,4 glicosídicas da celulose um abundante componente da parede de células vegetais, sendo classificadas de acordo com a *Enzyme Commission* (EC) com o código 3.2.1.x. Esse grupo de enzimas hidrolisam as ligações glicosídicas na matriz celulósica gerando como produtos primários glicose, celobiose e celo-oligossacarídeos (SINGHANIA *et al.*, 2010).

A transformação bioquímica da molécula de celulose durante sua biodegradação por microrganismos é catalisada por um sistema de enzimas extracelulares que compõem o complexo celulolítico (celulase) (ACHARYA, S e CHAUDHARY A., 2012). Os três componentes de celulases são responsáveis pela quebra da celulose, sendo este as endoglucanases (EnG), exoglucanases (ExG) e β -glicosidases (BG) (SINGHANIA *et al.*, 2010). Estas três classes de enzimas, em conjunto, apresentam especificidade por ligações β -1,4 e sinergismo na atuação, sendo tal mecanismo de hidrólise o mais aceito (SINGHANIA *et al.*, 2010).

As endoglucanases (EnG) são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Tais enzimas hidrolisam as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, clivando ligações β -1,4 na região central da molécula e liberando açúcares e oligossacarídeos (LYND *et al.*, 2002).

O grupo das exoglucanases é constituído pelas celobiohidrolases do tipo I e II (CBHs I e II) e pelas glucanohidrolases (GHs). Essas enzimas, embora pouco reportadas, possuem estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois são capazes de liberar glicose diretamente do polímero (LYND *et al.*, 2002). Essas enzimas atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose (CAO e TAN, 2002). As celobiohidrolases do tipo I hidrolisam terminais redutores, enquanto que as do tipo II hidrolisam terminais não redutores.

As enzimas β -glicosidasas, conhecidas também como celobiasas, possuem propriedade de hidrolisar celobiose e alguns oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND *et al.*, 2002; LYND e ZHANG, 2002).

Segundo Lynd *et al.* (2002), quando atuam conjuntamente, as enzimas celulolíticas apresentam um rendimento melhor que a soma dos rendimentos individuais. De acordo com os autores, as enzimas celulolíticas não atuam individualmente no substrato celulósico e, conseqüentemente, não hidrolisam a celulose de maneira eficiente, sendo necessária uma ação de sinergismo.

O esquema da Figura 6 apresenta a classificação das celulasas de acordo com o local onde agem na matriz celulósica.

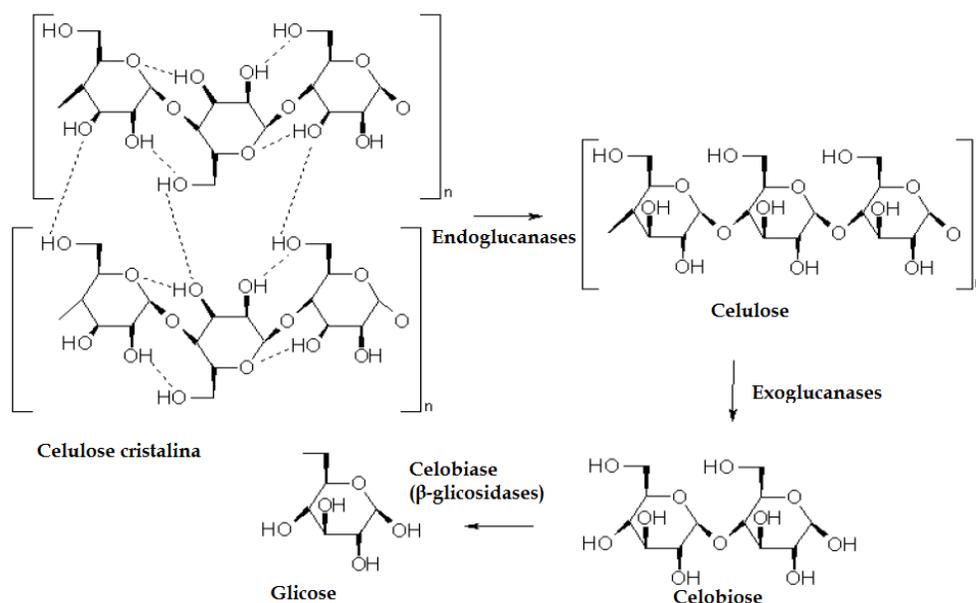


Figura 6- Atuação das enzimas da celulase sobre a estrutura da celulose

Fonte: Adaptado de Kamakar e Ray (2011).

Em bactérias anaeróbicas, ocorre a presença de celulosomos, termo introduzido primeiramente a partir do estudo da bactéria anaeróbica *Clostridium thermocellum* (DESVAUX, 2005). Os celulosomos são definidos como um complexo multienzimático, que possui celulasas que atuam de modo agrupado. Os microrganismos que secretam os celulosomos sobre o substrato são tipicamente encontrados em ambientes anaeróbicos,

como trato digestivo de ruminantes (LYND *et al.*, 2002). A presença de celulosomas em bactérias garante a adesão direta e específica no substrato de interesse, permitindo melhor eficiência na competição por nutrientes com outros microrganismos presentes na mesma biota e a proximidade entre a célula e a celulose (DESVAUX, 2005).

3.1.2.1 Estrutura

As celulasas possuem massas molares que abrangem um intervalo de 34 kDa a 250 kDa, pois podem ser sintetizadas como monômeros ou na forma de estrutura quaternárias constituídas por várias unidades peptídicas (VAN TILBEURGH, CLAEYSSENS, 1985). A massa molecular das celulasas dos fungos pode variar muito. A maioria das endoglucanases tem peso molecular entre 25 a 50 kDa, exoglucanases entre de 41 a 68 kDa, enquanto que as β -glucosidases são maiores, variando entre 165 e 182 kDa. Estudos envolvendo *Phanerochaete chrysosporium* mostraram que a variação para esta espécie pode apresentar entre 28 e 37 kDa (endoglucanases) e 114 kDa (β - glucosidase) (ERIKSSON *et al.*, 1990).

A estrutura dessas enzimas é constituída por uma sequência complexa e específica de aminoácidos, sendo dividida em três regiões: o domínio catalítico (DC), que constitui a parte da molécula em que ocorre a catálise e abrange cerca de 90% do número total de aminoácidos da sequência peptídica; a região de ligação (RL), que contém uma pequena quantidade de aminoácidos altamente glicosilados, cuja função é ligar o domínio catalítico a uma terceira região constituída pelo módulo de ligação a carboidratos (MLC), os MLCs que são pequenos polipéptidos estáveis que podem conter de quarenta a cento e vinte aminoácidos e são localizados, na cadeia de aminoácidos da enzima (CASTRO, A; PEREIRA, Jr. N. 2010).

As principais funções dos MLCs são: manter a enzima próxima ao substrato, de forma a aumentar a taxa de degradação do polissacarídeo; aumentar a especificidade da enzima na atuação de regiões seletivas da molécula do substrato e romper interações químicas da cadeia do substrato, especialmente se essa apresenta elevada cristalinidade (LYND *et al.*, 2002).

3.1.2.2 Fontes e Propriedades

As celulasas são encontradas em plantas, insetos, bactérias, fungos e arqueas (WATANABE, H. e TOKUDA, G., 2010). Em um ecossistema típico de degradação de celulose, uma variedade de bactérias e fungos trabalha em conjunto com outros microrganismos para converter substratos celulósicos insolúveis em açúcares solúveis que são então assimilados pelas células (LYND *et al.*, 2002).

Em bactérias, existe a presença de microrganismos decompositores da celulose, tanto aeróbios como anaeróbios (SINGH; HAYASHI, 1995; LYND *et al.*, 2002). Em bactérias aeróbias, são descritos como produtores de celulasas o gênero *Cellulomonas*, espécies *Bacillus*, tais como *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus cereus* (SINGH; HAYASHI, 1995). Entre as bactérias anaeróbias estão os gêneros *Acetivibrio*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, capazes de formar celulosomas (LYND *et al.*, 2002; DESVAUX, 2005).

Os fungos são os microrganismos mais bem conhecidos como capazes de decompor a matéria orgânica em geral e, em particular, os substratos de celulose (MARCO, 2012). Atualmente, as celulasas comerciais ainda são derivadas de fungos, embora as celulasas bacterianas estejam se mostrando competitivas em relação à eficiência na hidrólise da celulose. O *Trichoderma reesei* é o mais conhecido produtor de celulasas em escala industrial e tem sido estudado desde sua descoberta, durante a Segunda Guerra Mundial, é considerado um poderoso fungo para a degradação de celulose cristalina, pois pode secretar grandes quantidades de celulase (acima de 100 g/L) com alta atividade específica (WILSON, D, 2009; GUSAKOV, 2011). Outras espécies, como *Humicola insolens*, são utilizadas como produtores de enzimas comerciais com diferentes propósitos (SUKUMARAN, R.; SINGHANIA, R.; PANDEY, 2005).

Dentro de centenas de espécies de Zygomycetos, apenas certos membros do gênero *Mucor* tem mostrado possuir uma atividade celulásica significativa. Em contraste, gêneros pertencentes às subdivisões Ascomycetos (*Bulgaria Chaetomium e Helotium*), Basidiomicetos (*Coriolus, Phanerichaete, Poria, Schizophyllum e Serpula*) e Deuteromicetos (*Aspergillus, Cladosporium, Fusarium, Penicillium e Trichoderma*) contêm um grande número de espécies celulolíticas (MARCO, 2012).

Com o intuito de se utilizar as celulasas em processos industriais sob suas condições de melhor atuação, é imprescindível que suas propriedades sejam determinadas,

especialmente no que tange a fatores cinéticos e físico-químicos (CASTRO; PEREIRA, 2010). De forma geral, as celulases produzidas por fungos filamentosos apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6-5,0), enquanto que bactérias chegam a produzir celulases altamente ativas em valores de pH alcalinos (CASTRO; PEREIRA, 2010). Já as temperaturas ótimas para atuação encontram-se acima de 40°C (CASTRO, A.; PEREIRA Jr, N., 2010).

Em relação a propriedades cinéticas, os valores das constantes KM –Constante de Michaelis-Menten; e Vmáx – Velocidade máxima; em geral variam em ordem de grandeza, possivelmente devido à heterogeneidade das metodologias de quantificação, à forma de apresentação de seus valores, ao substrato utilizado e, principalmente, à origem do extrato enzimático utilizado (SHIN, *et al.*, 2000; AIELLO; FERRER; LEDESMA, 1996).

3.1.2.3 Aplicações Biotecnológicas

As celulases possuem uma ampla faixa de aplicações. A utilização das celulases teve seu uso mais intenso nos primeiros anos da década de 80, primeiro na indústria de alimentação animal, seguido na aplicação na indústria de alimentos. Subsequentemente, estas enzimas foram aplicadas na indústria têxtil e de lavanderia. Atualmente, as enzimas do complexo celulolítico estão classificadas em terceiro lugar como as enzimas que mais movimentam o mercado de enzimas devido às variadas aplicações no processamento de algodão, na reciclagem de papel, na extração de suco, no uso como enzimas detergentes e produção de aditivos para a alimentação animal. (SINGHANIA *et al.*, 2010).

Existe ainda uma tendência mundial para a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, buscando açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol em larga escala (ZHANG *et al.*, 2006). O uso de celulases para este fim tem como entrave o custo de produção, que pode ser superado utilizando microrganismos geneticamente modificados (bactérias, leveduras e fungos) para a produção das enzimas (MARTIN, 2007). A expectativa é de que o mercado de celulases seja superior a 400 milhões de dólares por ano, com a possível utilização dessas enzimas na hidrólise de palha de milho, para a produção de etanol de biomassa, nos Estados Unidos da América (ZHANG *et al.*, 2006).

Dentre outras aplicações de celulases estão seu uso na indústria de alimentos, juntamente com hemicelulases e pectinases, tais como: em processos de maceração enzimática; fermentação de cerveja e produção de vinho; extração e clarificação de sucos de

frutas e vegetais; produção de néctares de frutas e purês; alteração das propriedades sensoriais de frutas e vegetais e; extração de óleos. Também são plenamente usadas como aditivos na indústria de ração animal, indústria têxtil e indústrias de polpa e papel, assim como na agricultura e para propósitos de pesquisa (BHAT, 2000).

3.1.3 *Proteases*

As proteases são enzimas responsáveis por catalisar a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas e podem apresentar atividade sobre ligações éster e amida (KOBLOITZ, 2010). A produção de proteases em fermentações por um determinado microrganismo pode afetar a ação de outras enzimas, como as celulases e lipases, uma vez que as proteases podem causar a modificação e a degradação de muitas proteínas, portanto, devem ser estudadas em conjunto com a produção das enzimas de interesse durante a pesquisa (AHAMED et al, 2005).

As proteases executam uma grande variedade de funções fisiológicas complexas. Sua importância em conduzir o metabolismo essencial e as funções regulatórias se torna evidente a partir da sua ocorrência em todos os organismos vivos existentes. As proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para conseqüente absorção pela célula, enquanto as intracelulares possuem um papel vital na regulação do metabolismo (RAO *et al.*, 1998).

3.1.3.1 Estrutura

As proteases são classificadas como classe 3 e subclasse 3.4 peptidases. Elas ainda podem ser subdivididas em exopeptidases (E.C. 3.4.11-19) e endopeptidases ou proteinases (E.C. 3.4. 21-99). As primeiras atuam somente sobre as extremidades das cadeias polipeptídicas. Enzimas que agem sobre a extremidade N- ou C-terminal são conhecidas como amino ou carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases operam em regiões internas das cadeias polipeptídicas, longe das extremidades (RAO *et al.*, 1998).

Quanto à estrutura química do sítio ativo, as exopeptidases são definidas como serino proteases (E.C. 3.4.21), cisteíno proteases (E.C. 3.4.22) e metalo proteases (E.C. 3.4.24). As

endopeptidases apresentam, além das citadas acima, as chamadas aspártico proteases (E.C. 3.4.23) (LEOPOLD e FRICKE, 1997).

As serino proteases apresentam um resíduo de serina (Ser/S) em seu sítio catalítico. São amplamente produzidas pelos organismos, o que sugere seu papel vital. São ativas em pHs neutros a alcalinos, com um valor ótimo entre 7 e 11. O ponto isoelétrico (pI) está na faixa entre 4 e 6 e sua massa molecular varia entre 18 e 35 kDa. Algumas serino proteases podem atuar em pHs bastante alcalinos, o que as torna ideais para a aplicação, por exemplo, na indústria de detergentes (RAO *et al.*, 1998).

As cisteíno proteases ou tiol proteases dependem de um resíduo de cisteína (Cys/C) para sua atuação e são ativas em pH neutro. Já as metalo proteases requerem um íon divalente, normalmente o Zinco (Zn^{+2}), para a catálise. Podem ser ácidas, neutras ou alcalinas (LEOPOLD e FRICKE, 1997; RAO *et al.*, 1998).

As aspártico proteases são conhecidas também como proteases ácidas e contêm dois resíduos de ácido aspártico (Asp/D) no seu sítio ativo. O pH ótimo de atuação varia entre 3 e 4 e o pI entre 3 e 4,5. A massa molecular se encontra entre 30 e 45 kDa (RAO *et al.*, 1998).

3.1.3.2 Fontes e propriedades

Os microrganismos responsáveis pela produção de proteases são os fungos e as bactérias, devido à maior facilidade de cultivo e obtenção da enzima (BERNARDI *et al.*, 1991). Em geral, as enzimas fúngicas têm um pH ótimo ácido ou neutro, não sendo termoestáveis. Por outro lado, as proteases bacterianas possuem um pH ótimo alcalino ou neutro, sendo com frequência termoestáveis (WISEMAN, 1991).

As proteases produzidas por plantas requerem um processo de obtenção mais demorado, pois dependem da disponibilização de área para cultivo e também das condições climáticas. As proteases de origem animal dependem da disponibilidade de animais para o abate, tornando o processo dispendioso. Neste contexto, os microrganismos são preferidos frente a outras fontes de proteases devido ao seu rápido crescimento e ao pequeno espaço requerido para seu cultivo (RAO *et al.*, 1998). Além disso, as proteases microbianas são, em geral, mais estáveis que as homólogas de plantas e animais e o seu processo de produção é mais fácil e mais seguro (WISEMAN, 1991).

Proteases oriundas de microrganismos são produzidas por manipulação de condições ambientais devidamente controladas. É grandemente influenciada por componentes, especialmente de carbono e nitrogênio e os 24 fatores físicos tais como temperatura, pH, tempo de incubação, agitação e densidade do inóculo (QURESHI et al., 2011).

3.1.3.3 Aplicações biotecnológicas

Estas enzimas representam, atualmente, 60% do mercado mundial de enzimas, sendo 40% deste mercado referente às proteases de origem microbiana (JOHNVESLY e NAIK, 2001). Estima-se um mercado anual de um bilhão de dólares em todo o mundo (RAO *et al.*, 1998)

As enzimas proteolíticas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas comerciais. Essas enzimas apresentam grande utilização em processos industriais, tais como na indústria de detergentes, farmacêutica, cosméticos, bem como indústrias de couro e alimentos (KUMAR e TAKAGI, 1999; GUPTA e BEG, 2002).

Em vista da recente tendência do desenvolvimento de tecnologias ambientais, as proteases são utilizadas no tratamento de couro e em vários processos de biorremediação. As proteases são um dos ingredientes padrão adicionado a todos detergentes devido, principalmente, à especificidade em relação a alguns substratos constituintes do material a ser removido. Na indústria de alimentos são amplamente utilizadas em laticínios, massas e na produção de hidrolisados protéicos. Na indústria farmacêutica, as proteases são utilizadas em formulações como auxiliares digestivos, combinações com antibióticos e para tratamentos de lesões (RAO *et al.*, 1998).

A hidrólise protéica é uma tecnologia amplamente desenvolvida como forma de agregar valor, funcionalidade e expandir o leque de aplicações para materiais de uso pouco convencional, subprodutos e resíduos da indústria de alimentos (THYS *et al.*, 2004). Na Tabela 1 são mostradas as diversas origens das proteases, bem como suas respectivas aplicações industriais.

Tabela 1: Aplicações industriais das enzimas obtidas de plantas, animais e microrganismos.

Fonte	Enzima	Aplicação
Animal	Tripsina, Quimotripsina, etc	Indústria farmacêutica, de couro, processamento de alimentos, especialmente hidrólise de proteínas e síntese de peptídeos.
Vegetal	Papaína, Ficina, Bromelaína	Produção de extratos de leveduras, cerveja resistente ao congelamento, panificação, fármacos, amaciamento de carne.
Microrganismos (<i>Aspergillus niger</i>)		Queijo, carnes, pescado, cereais, bebidas.
Microrganismos (<i>Aspergillus oryzae</i>)	Proteases ácidas e neutras	Hidrólise protéica, processamento de carne e pescado, indústria cervejeira e de panificação.
Microrganismos (<i>Aspergillus melleus</i> , <i>Endothia parasítica</i> , <i>Mucor miehei</i> e <i>Mucor pusillus</i>)		Manufatura de queijo (coagulação do leite).
Microrganismos (<i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i>)	Proteases alcalinas	Fabricação de detergentes e indústria de couro, processamento de carnes, pescados e derivados lácteos.
Microrganismos (<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i>)	Protease neutra	Produção de bebidas e panificação.

Fonte: (Wiseman, 1991).

3.2 Processos Fermentativos para Produção Enzimática

Os dois principais processos para a produção de enzimas por microrganismos são conhecidos como fermentação no estado sólido - FES; e a fermentação submersa- FSb. Incontestavelmente, um dos parâmetros mais exaltados na diferenciação desses dois tipos de processos é o teor de água presente no meio reacional (CASTRO; PEREIRA, 2010).

A fermentação em estado sólido é fundamentada no crescimento de microrganismos sobre suportes sólidos úmidos na ausência ou próximo da ausência de água livre entre as partículas do material sólido. Este suporte pode ser qualquer substrato natural, que será usado como fonte de carbono e energia, ou ainda, pode servir como suporte inerte com a possibilidade de ser enriquecido com solução nutriente (BHANU-PRAKASH *et al.*, 2008; DIORIO *et al.*, 2008). Os requerimentos de água pelos microrganismos são mais bem expressos em termos de atividade de água, que representa a disponibilidade de água no substrato sólido, os valores típicos de atividade de água para substratos sólidos encontram-se entre 0,96 e 0,98 (MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2000). Estas atividades de água são ideais para o crescimento de muitos fungos, especialmente fungos filamentosos, os quais tipicamente crescem otimamente em atividades de água de 0,96-0,98, e ainda crescem razoavelmente bem em atividades de água abaixo de 0,9, e, como resultado, a maioria dos processos de SSF envolvem fungos filamentosos. Em contraste muitas bactérias e leveduras crescem melhor em atividades de água em torno de 0,99, com o crescimento diminuindo rapidamente como a queda da atividade de água, sendo o crescimento completamente inibido com valores em torno de 0,9 (MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2000).

A água possui diversas funções em um bioprocessos, tais como, a difusão de nutrientes no meio reacional e a absorção destes pelos agentes microbianos, bem como a remoção de metabólitos e a manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas, como proteínas, nucleotídeos e carboidratos e da estabilidade da estrutura lamelar e da conservação da permeabilidade da membrana plasmática (CASTRO e PEREIRA, 2010). Em relação ao cultivo de fungos filamentosos, a limitação de água pode causar a desnaturação de enzimas-chave do metabolismo das células, ocasionando um desequilíbrio nas vias metabólicas; afetar os processos de germinação, esporulação e formação de metabólitos, assim como reduzir a taxa de crescimento microbiano e aumentar o período de aclimação celular (CASTRO e PEREIRA, 2010).

A fermentação submersa por sua vez, é definida como aquela cujo substrato fica dissolvido ou suspenso em pequenas partículas no líquido, normalmente água. Na FSb a água chega a constituir cerca de 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado (SANTOS, 2012). Esse tipo de fermentação apresenta como principais vantagens, o fácil acompanhamento da formação do produto e consumo do substrato e o controle dos

parâmetros fermentativos como pH, temperatura, oxigenação e esterilidade (HOLKER e LENZ, 2004). De acordo com Mitchell e colaboradores (2000), este processo tem como principais desvantagens o grande volume de resíduos gerados e a dificuldade de separação produto / substrato.

A escolha do meio fermentativo deve levar em conta alguns fatores que visem propiciar ao microrganismo o ambiente o mais favorável possível para a realização do processo, um deles é o ambiente físico do meio (sólido ou líquido), que varia para cada tipo de microrganismo. Entre os microrganismos, os fungos, tem maior capacidade de crescimento em fermentação sólida, pois esta simula bem o ambiente em que naturalmente são encontrados, enquanto bactérias e leveduras, devido ao ser caráter unicelular, tem maior habilidade em absorver nutrientes do meio líquido (SHARMA *et al.*, 2001; LI e ZONG, 2010). Entretanto apesar da FES ser conhecida como um sistema apropriado para a produção de enzimas e outros metabólitos por fungos, a necessidade de agitar o leito do biorreator, para ajudar na remoção de calor, traz como problema danos para o micélio do fungo, e conseqüentemente, efeitos deletérios no crescimento, devido às forças de cisalhamento existentes num leito de sólidos agitado (LI e ZONG, 2010). Outro parâmetro importante para o desenvolvimento do meio fermentativo é a composição química, pois a escolha do indutor ideal é um fator determinante para produtividade da enzima (CONTESINI *et al.*, 2010; IFTIKHAR *et al.*, 2010; LI e ZONG, 2010).

Quando se objetiva a em produção em larga escala de enzimas por fermentação, o uso de um substrato de alto custo pode ocasionar um grande aumento do valor do produto final, portanto o barateamento deste componente do meio se faz importante (FERNANDES, 2006; DAMASO *et al.*, 2008). Ressalte-se que a Fsb pode se apresentar como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados, bem como, agregar valor a essas matérias-primas, por meio da produção de substâncias de interesse econômico, como as enzimas (PINTO *et al.*, 2005)

3.2.1 Fermentação Submersa para a Produção de Lipase por Fungos

Segundo Colen, Junqueira e Moraes-Santos (2006), os fungos filamentosos quando estão sendo cultivados em condições favoráveis de crescimento são capazes de secretar

quantidades significativas de lipases, sendo as espécies pertencentes aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor*, as melhores produtoras.

Comumente, a produção de lipase atinge seu ponto máximo quando a cultura entra na fase estacionária de crescimento, em seguida, a atividade diminui rapidamente, pois ocorre a proteólise catalisada por proteases produzidas durante a fase de crescimento celular (ZAREVUCKA *et al.*, 2005; DALMAU *et al.*, 2000)

Em relação a produção de lipase por fermentação, estudos foram realizados por Tan e co-autores (2004), para a otimização das condições de cultivo de *Penicillium camembertii* Thom PG-3 por fermentação submersa em frascos agitados, visando a produção de lipase. A melhor formulação do meio de cultura, após a avaliação de fontes de nitrogênio, fontes de carbono e sais minerais diversos foi (em %; p/v): farelo de soja desengordurado (4,0); óleo de jojoba (0,5); (NH₄)₂HPO₄ (0,1); Tween 60 (0,1). Foi utilizado o pH inicial de 6,4, a melhor temperatura de incubação foi de 28° C e o tempo de fermentação foi de 96 h, obtendo atividade máxima de 500 UmL⁻¹.

Matos e colaboradores (2011), em estudo sobre a caracterização bioquímica para uma eficiente aplicação industrial da lipase obtida por fermentação submersa de *Geotrichum candidum* obteve valores de temperatura ótima de 27°C, com uma atividade enzimática máxima de 99,44 UmL⁻¹.

Roveda, Hemkemeier e Colla (2010), avaliaram a produção de lipases por fungos isolados a partir de efluentes de laticínios. Foram isolados 21 fungos, pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Fusarium*. Na etapa de seleção, 9 fungos foram selecionados em função da capacidade de crescimento em meio contendo azeite de oliva como substrato. Na fermentação submersa, os fungos E₉ (*Aspergillus*), E₂₁ (*Aspergillus*) e E₂₀ (*Penicillium*) foram os que apresentaram as maiores atividades enzimáticas, de 1,250 a 2,250 UmL⁻¹, utilizando-se como meio de cultivo o efluente coletado na saída do equalizador do sistema de tratamento de efluente.

3.2.2 Fermentação Submersa para a Produção de Celulase por Fungos

Fungos filamentosos quando estão sendo cultivados em condições favoráveis de crescimento, são capazes de secretar quantidades significativas de celulases, portanto, a

produção em larga escala de enzimas celulásicas requer o adequado conhecimento acerca desses parâmetros (SINGHANIA *et al.*, 2010). O meio de cultura a ser utilizado é específico para cada microrganismo analisado. Várias pesquisas abrangem a resposta dos fungos para a produção de celulases frente a diferentes alterações na composição do meio de cultura, com o intuito de aumentar a produção de enzimas e reduzir os custos de produção.

Em estudo Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) avaliaram a produção de celulase por fungos isolados do solo da Mata Atlântica, a melhor atividade CMCCase (carboximetilcelulase) de $1,64 \text{ UmL}^{-1}$ foi obtida com o cultivo de *Trichoderma harzianum* em meio de farelo de trigo, após o cultivo por 4 dias, na temperatura de 25°C .

Kocher, G.; Kalra, K.; Banta, G. (2007) avaliaram a produção de celulase por *Trichoderma harzianum* MTCC 8230 usando palha de arroz como substrato. As condições ótimas para a produção de celulase foram: fonte nitrogênio, uso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0,5 \text{ g L}^{-1}$; pH 5,0; temperatura de 28°C e; tamanho de inóculo de 10^8 esporos mL^{-1} . Adicionalmente o estudo concluiu que a adição de Tween 80 (0,1%) melhoraram a produção de celulase global sob estas condições otimizadas. As atividades das celulases em papel filtro, carboximetilcelulose e celobiase foram $0,127$, $0,15$ e $1,65 \text{ UmL}^{-1}$, respectivamente.

Singh, A.; Singh, N. e Bishnoi (2009), investigaram a produção de celulases a partir de *Aspergillus heteromorphus*, por fermentação submersa utilizando palha de trigo como substrato. A otimização das condições de sacarificação foi estudada, tendo como variáveis o pH, temperatura e tempo. A maior redução de açúcar foi alcançada no 5º dia, com pH 5 e temperatura de 30°C , sendo que as atividades de papel filtro e de CMCCase, foram $3,2 \text{ UmL}^{-1}$ e 83 UmL^{-1} , respectivamente.

Ramanathan, Banupriyaand e Abirami (2010), avaliaram a produção de celulases por *Fusarium oxysporum*, isolado a partir de partes de plantas de tomate infectadas, utilizando o meio de cultura caldo contendo 1% de celulose CMC (carboxi-metil) como um substrato. A produção máxima de celulase foi encontrada com os parâmetros ótimos de pH 6,0, temperatura 50°C e período de incubação de 12 dias, sendo a atividade em filtro de papel de $0,654 \text{ UmL}^{-1}$, CMCCase $0,542 \text{ UmL}^{-1}$ e β -glicosidase de $0,769 \text{ UmL}^{-1}$.

Santos (2013), estudou a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por três linhagens de fungos filamentosos isoladas de amostras ambientais, utilizando resíduos sólidos da cadeia produtiva do biodiesel como fontes de carbono, sendo os resíduos a torta

de algodão, torta de girassol e a torta de Macaúba. Como parâmetro de comparação, utilizou-se o *Trichoderma reesei* CCT2768, linhagem conhecida como produtora de celulases. Dentre as linhagens avaliadas, um isolado denominado *Aspergillus* sp AN1257 foi o que se destacou para a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas, superando inclusive a produção de celulases por *T. reesei* nas mesmas condições fermentativas. A fonte de carbono que melhor induziu a produção das enzimas investigadas pelo *Aspergillus* sp AN1257 foi a torta de algodão. Após a aplicação das condições ótimas para a produção enzimática desejada, o extrato obtido apresentou valores de 3,12 UmL⁻¹ para atividade endoglucanásica.

3.3 Aproveitamento de Coprodutos da Extração do Óleo na Produção de Enzimas

Os processos biotecnológicos vêm sendo amplamente difundidos em vários segmentos industriais e possuem uma série de vantagens em relação aos processos químicos convencionais. (MEINHARDT *et al.*, 2005). O estudo de meios industriais de fermentação para obtenção de produtos biotecnológicos tem recebido grande atenção nos últimos anos (SILVA *et al.*, 2009; ERNANDES *et al.*, 2010).

Entre esses produtos biotecnológicos destaca-se a produção de enzimas, apesar do processo enzimático de hidrólise ser considerado de grande potencialidade, este enfrenta vários gargalos tecnológicos, sendo o custo de produção um dos pontos mais avaliados (MURUGAN *et al.*, 2011). Estima-se que aproximadamente 30-40% do custo envolvido na produção de enzimas é devido ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos microrganismos, portanto sua otimização é de grande importância para a redução dos custos (JOO; CHANG, 2005).

Nesse sentido, diversos coprodutos e matérias-primas da agroindústria têm sido empregados para obtenção de produtos biotecnológicos, pela alta disponibilidade e por representarem fonte alternativa de baixo valor comercial (SILVA *et al.*, 2009; ERNANDES *et al.*, 2010). Dentre as alternativas existentes destaca-se o emprego de coprodutos da extração do óleo, o qual tem-se mostrado uma fonte riquíssima de substratos (MURUGAN *et al.*, 2011).

Algumas biomassas oriundas da cadeia do biodiesel também merecem destaque por apresentarem altos teores de celulose e hemicelulose, além de lipídios em sua composição,

como as tortas de algodão, girassol, soja e Macaúba. Estes resíduos, além da possibilidade de serem utilizados na produção de bioetanol de segunda geração, podem ser aproveitados também como substrato (fonte de carbono) para produção de lipases e celulases (SANTOS, 2013).

A utilização destas biomassas como fonte de carbono nas fermentações por fungos filamentosos é uma estratégia economicamente promissora, no qual além de gerar agregação de valores à coprodutos de baixo valor agregado, levará a uma redução de custo no processo de produção de enzimas hidrolíticas (SANTOS, 2013).

Recentemente alguns pesquisadores utilizaram resíduos de alimentos provenientes de restaurantes para a produção de glicoamilases microbianas (WANG *et al.*, 2008). Resíduos provenientes da produção de biodiesel, tais como torta de pinhão manso e de mamona também tem sido aproveitada para a obtenção de lipases e proteases microbianas (MAHATAN *et al.*, 2008; GODOY *et al.*, 2009).

3.4 Macaúba

A Macaúba (*Acrocomia aculeata* (JACQ.) LODD. EX MART), destacada na Figura 7, possui também várias denominações brasileiras, tais como bocaíuva, bacaiuveira, bacaúva, coco-balão, coco-baboso, cocode-catarro, coco-de-espinha, coco-xodó, embocaia, macaiba, macaiá, macajá, macajuba, macaúva, macujá, marcová e mucajá (ALMEIDA, 1998). É uma palmeira nativa das florestas tropicais cujo estipe atinge de 10 a 15m de altura e 20 a 30 cm de diâmetro. A região de nós é coberta de espinhos escuros, pontiagudos com cerca de 10cm de comprimento. Frequentemente, o estipe é coberto pelas bases do pecíolo, que permanecem aderidas a estes por muitos anos (LORENZI *et al.*, 1996).



Figura 7- Palmeira Macaúba

Fonte: <http://www.arvores.brasil.nom.br/new/palmeiramacauba/index.htm>

Os frutos maduros da Macaúba, Figura 8, possuem coloração amarelo-esverdeada e podem ser coletados de setembro a março. Nessa fase exalam aroma característico e a casca tende a se soltar (BRASIL, 2002).



Figura 8- Fruto da palmeira Macaúba.

Fonte: Arquivo pessoal

O fruto é constituído por epicarpo (casca) de coloração verde, amarelo-esverdeada, marrom (claro a escuro), mesocarpo mucilaginoso e fibroso (polpa) que varia de cor amarelo-alaranjada a amarelo-esverdeada. Apresenta aspecto ceroso e muito aderente, endocarpo duro e denso (tegumento), e semente (amêndoa) adnata ao endocarpo (ALMEIDA, *et al.*, 1998). Os frutos, destacado na Figura 9, apresentam formato esférico de coloração amarelo-esverdeada e estão dispostos em forma de cachos na palmeira (LORENZI, 2006).



Figura 9-Fruto da Macaúba

Fonte: Arquivo pessoal

Trabalhos de literatura apresentam dados variáveis a respeito da composição dos frutos de uma mesma espécie, no caso a *Acrocomia aculeata*. Vários fatores contribuem para essa variabilidade: a variabilidade natural em função das condições do clima e solo da plantação, o estágio de maturação do fruto no momento da coleta, no condicionamento pós-colheita do fruto e o tempo decorrido entre a queda, colheita e análise laboratorial do fruto. Destaca-se que, o estágio ideal de maturação do fruto ocorre quando o fruto, ao amadurecer, se solta do cacho e cai. No chão, a polpa é atacada por microrganismos e sofre deterioração, o que altera as relações de massa entre as diversas partes do fruto e as características físico-químicas dos produtos e coprodutos (SZPIZ *et al.*, 1989; BRANDÃO *et al.*, 2014; MOREIRA e SOUSA, 2010; SILVA, 2011)

Esta espécie de palmeira possui qualidades que a tornam importante do ponto de vista natural, ecológico e principalmente socioeconômico, pois seus frutos são uma promissora e valiosa fonte de óleo vegetal, proporcionando vantagens ambientais, econômicas e sociais.

Sua capacidade de produção de óleo vegetal pode chegar a quatro mil litros por hectare por ano, sendo que através de plantios racionais e de programas de melhoramento este valor pode aumentar consideravelmente (NUCCI, S. M., 2007).

Além da alta produtividade de óleo comparado aos de outras oleaginosas, a Macaúba tem o potencial de produzir pelo menos dois tipos de óleo - da polpa e da amêndoa; dois tipos de tortas – da polpa e amêndoa e; carvão do endocarpo (MOREIRA e SOUSA, 2009). Quanto ao potencial alimentício, detectaram-se precursores da vitamina A nos frutos maduros de Macaúba (HIANE *et al.*, 2006; CARNEIRO, 2009).

3.4.1 O Óleo do Fruto

São dois os tipos de óleo da Macaúba. Da amêndoa é retirado um óleo fino, o qual representa em torno de 15% do total de óleo da planta, rico em ácido láurico (44%) e oleico (26%), tendo potencial para utilizações nobres na indústria alimentícia, farmacêuticas e de cosméticos. Já o óleo da polpa, com maior potencial para fabricação de biodiesel, é dominado por ácido oleico (53%) e palmítico (19%) (RETTORE, R.P.; e MARTINS, H, 1983).

Os perfis de ácidos graxos da polpa e da amêndoa segundo Rettore e Martins (1983) e Pimenta, (2010) estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Composição em % ácidos graxos dos óleos da polpa e da amêndoa da Macaúba

Ácidos Graxos	Rettore; Martins (1983)		Pimenta (2010)	
	Polpa	Amêndoa	Polpa	Amêndoa
C8:0 (caprílico)	-	6,2	-	4,15
C10:0 (cáprico)	-	5,3	-	4,22
C12:0 (láurico)	-	43,5	-	41,42
C13:0	-	-	-	0,03
C14:0 (mirístico)	-	8,5	0,03	7,98
C16:0 (palmítico)	18,7	5,3	16,51	5,98

C16:1 (palmitoléico)	4,0	-	2,92	-
C16:1 <i>trans</i>	-	-	0,05	-
C17:0 (margárico)	-	-	0,05	-
C17:1(heptadecenóico)	-	-	0,08	3,38
C18:0 (esteárico)	2,8	2,4	2,89	29,22
C18:1 (oleico)	53,4	25,5	67,67	3,43
C18:2 (linoleico)	17,7	3,3	8,82	-
C18:3 (linolênico)	-	-	0,81	0,14
C20:0 (araquídico)	-	-	0,16	-
Saturados	21,5	71,2	19,64	67,30
Insaturados	76,6	28,8	80,35	32,65

3.4.2 *Torta da Polpa da Macaúba*

A torta do mesocarpo da Macaúba é um coproduto da extração do óleo do mesocarpo da Macaúba. Estimativas feitas com frutos de Macaúba de ocorrência no Estado de Mato Grosso do Sul, indicam uma produção de biomassa por hectare de 25000 kg de frutos geraria 10000 kg de torta de polpa, em base úmida (CICONINI *et al.*, 2013).

A composição da torta da polpa depende do método de extração utilizado, da composição química da matéria-prima e dos processos adequados ou não de conservação e beneficiamento dos frutos, que podem acarretar em tortas com diferentes características de qualidade, principalmente em relação a acidez da torta, ou seja, a quantidade de ácidos graxos livres e triglicerídeos presente nas mesmas.

Comumente as tortas contêm moderadas quantidades de proteínas e carboidratos e lipídios e são tradicionalmente utilizadas como complemento na alimentação animal (RAMACHANDRAN *et al.*, 2009). Na Tabela 3 encontra-se a composição centesimal da torta de Macaúba, segundo Santos (2011), indicando que este resíduo pode ser utilizando como suporte para a produção de hidrolases devido suas características nutricionais.

Tabela 3: Composição centesimal da torta de Macaúba

Composição (%)	Torta da Macaúba
Umidade	2,64
Lipídios	22,50
Cinzas	5,00
Fibra	8,70
Proteína bruta	6,40
Açúcares solúveis totais	8,82
Amido	23,90
Celulose	10,90
Hemicelulose	9,60
Lignina	0,42

Fonte: Santos, 2011

A quantidade de resíduos gerados na cultura do coco da Macaúba para extração de óleos gira em torno de 14,5 t/ha.ano (SILVA; BARRICHELO; BRITO,1986). Um destino adequado para estes resíduos é necessário, e sua utilização por tecnologias de aproveitamento de resíduos seria uma forma de acabar com esse problema ambiental e viabilizar a cadeia de produção do biodiesel agregando valor aos subprodutos.

Estudos buscam reaproveitar esse resíduo rico em fibras tanto como alternativa para uso na alimentação (humana e ruminantes), como para seu uso economicamente rentável para a produção industrial de enzimas, etanol de segunda geração (etanol celulósico), produção de combustíveis gasosos e bio-óleo (RUFINO *et al.*, 2011; EMBRAPA, 2013; FARIAS *et al.*, 2012).

Poucos estudos avaliaram a torta de Macaúba com substrato para produção de enzimas por fermentação submersa, dentre estes, Santos (2013), avaliou a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por fungos filamentosos utilizando resíduos da cadeia do biodiesel como fonte de carbono, entre os resíduos analisados a torta de Macaúba.

Silva (2012), estudou a produção de amilases por *Bacillus amyloliquefaciens* utilizando torta de Macaúba (*Acrocomia aculeata*) e farinha de pupunha (*Bactris gasipaes*) como substratos. A máxima produção das amilases foi alcançada com 24 horas de

fermentação, S/L de 12% e pH 7,0, obtendo valores de 3,393 UmL⁻¹ com a farinha de pupunha e 1,96 UmL⁻¹ com a torta de Macaúba como substratos.

Farias (2012), avaliou a viabilidade técnica de crescimento, bem como a produção de lipase extracelular pela levedura modificada geneticamente *Yarrowia lipolytica* em fermentação em estado sólido da torta de Macaúba. O melhor resultado encontrado foi 89Ug⁻¹ de substrato seco em 72h de fermentação. A lipase desta levedura apresentou elevado potencial biotecnológico, uma vez que a torta do fruto da Macaúba funcionou como uma excelente fonte de carbono para *Yarrowia lipolytica*, minimizando assim a suplementação do meio e, por conseguinte, os custos relacionados com a produção.

4 METODOLOGIA

4.1 Metodologia Esquematizada

A Metodologia de desenvolvimento deste trabalho é apresentada na forma de uma síntese esquemática nas Figuras 10 e 11. Na sequência, descreve-se o detalhamento dessa Metodologia.

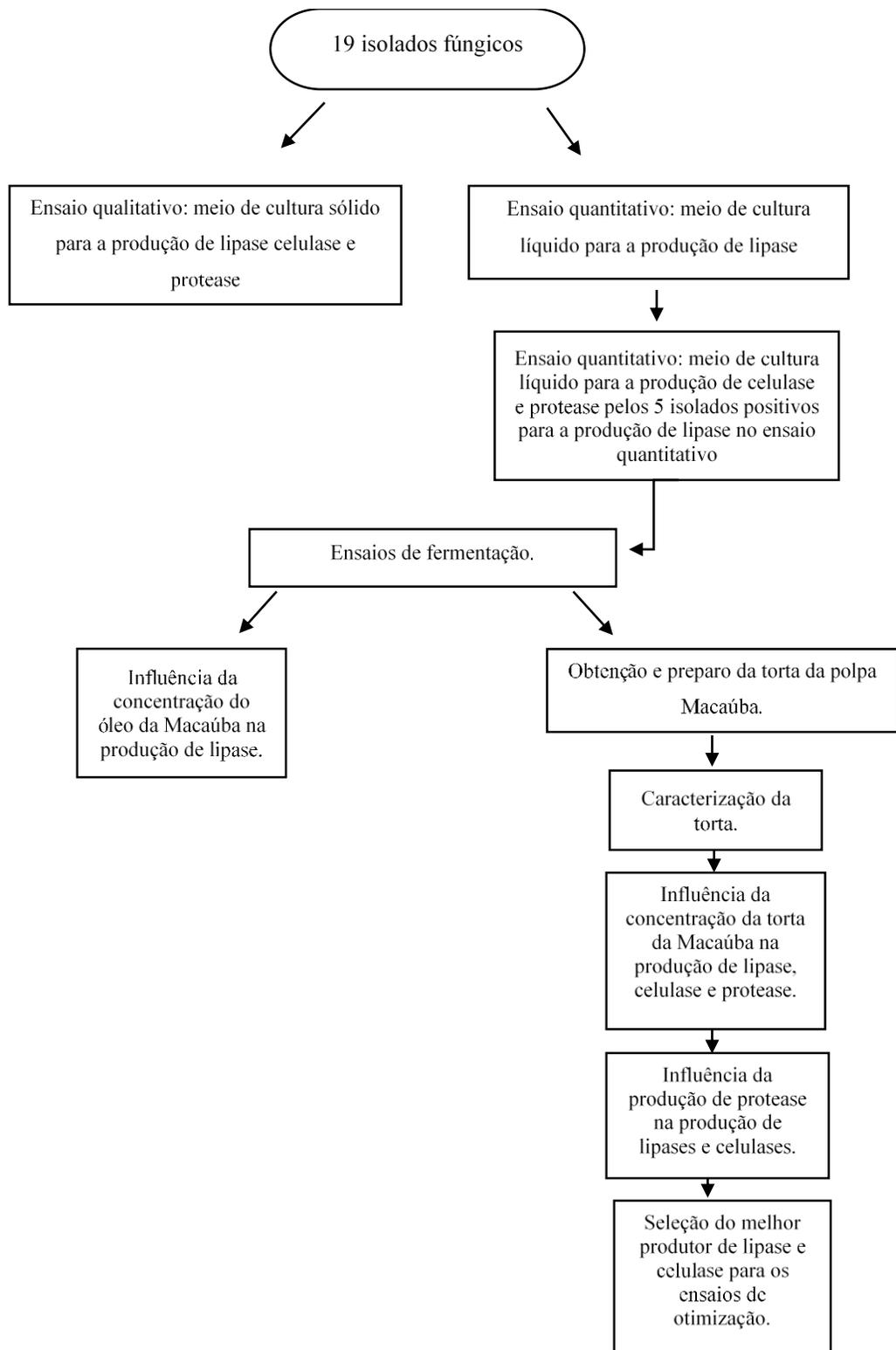


Figura 10: Metodologia para seleção de microrganismos produtores de lipase e celulase

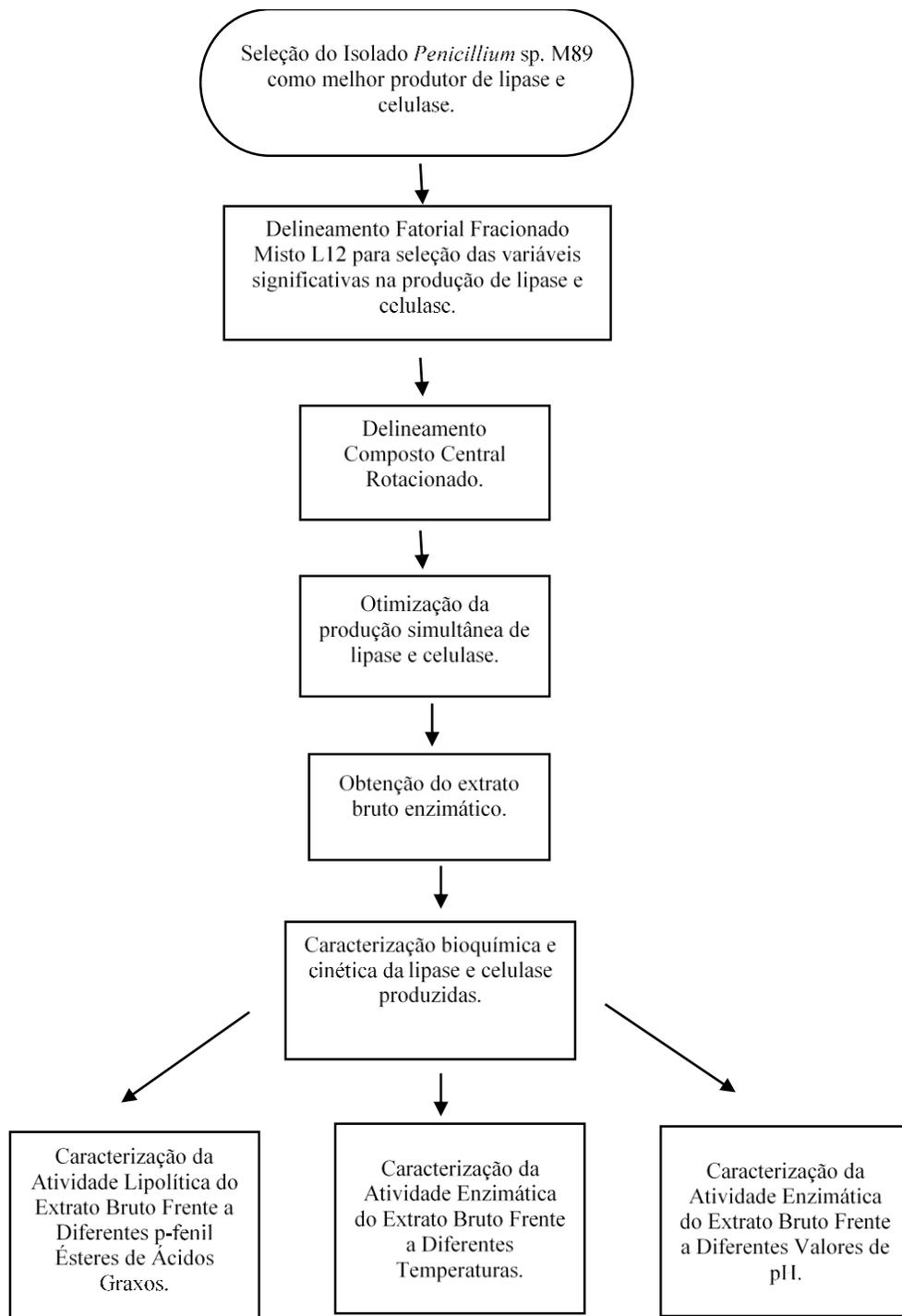


Figura 11: Metodologia para a otimização do processo de produção simultânea das enzimas lipase e celulase

4.2 Local

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Processos e Produtos da Macaúba/DEQ e no Laboratório de Microbiologia do Aplicada (LMA) /ICB, ambos situados no Campus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Belo Horizonte, MG.

4.3 Microrganismos Produtores de Enzimas

Foram utilizados neste estudo dezenove fungos filamentosos isolados do fruto Macaúba, obtidos a partir de frutos de palmeiras macaúba, localizadas na região de Casa Branca, Brumadinho, MG. A coleta dos frutos utilizados no isolamento foi feita a partir de 7 palmeiras de macaúbas, provenientes de formações nativas de diversas áreas na região. Os frutos foram coletados de palmeiras selecionadas ao acaso, totalizando 24 cocos por indivíduo, o isolamento e identificação foram realizados por pesquisadores do LMA/ICB-UFMG.

Os isolados estão depositados na Coleção de Micro-organismos e Células do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. As linhagens estudadas foram escolhidas a partir de resultados de seleção previamente realizada por pesquisadores do LMA/ICB-UFMG, como microrganismos produtores de lipases. Os isolados e seus respectivos gêneros e espécies podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4: Microrganismos Isolados do fruto da Macaúba

Numeração	Isolado	Identificação
1	M1	<i>Penicillium chrysogenum</i>
2	M8	<i>Nectria pseudotrichia</i>
3	M12	<i>Talaromyces striatus</i>
4	M19	<i>Cladosporium</i> sp.
5	M23	<i>Penicillium mallochii</i>
6	M26	<i>Penicillium olsonii</i>
7	M27	<i>Pleosporales</i> sp.
8	M29	<i>Penicillium vanoranjei</i>
9	M62	<i>Fusarium proliferatum</i>
10	M70	<i>Phomopsis longicolla</i>
11	M89	<i>Penicillium</i> sp.

12	M109	<i>Penicillium</i> sp.
13	M124	<i>Penicillium paxilli</i>
14	M162	<i>Botryosphaeria dothidea</i>
15	M165	<i>Penicillium</i> sp.
16	M184	<i>Fusarium</i> sp.
17	M221	<i>Penicillium</i> sp.
18	M228	<i>Penicillium spinulosum</i>
19	M233	<i>Fusarium</i> sp.

4.4 Manutenção dos Microrganismos Fúngicos

As linhagens apresentadas na Tabela 4 foram mantidas no LMA. O processo de estoque das linhagens incluiu a conservação dos microrganismos em criotubos com solução 20% de glicerol na temperatura de -80°C, e, adicionalmente, em frascos de penicilina de 10 ml, conforme método de conservação de Castellani (CASTELLANI, 1939). Para o processo de manutenção dos microrganismos foram realizados repiques periódicos, a cada 30 dias, sendo as culturas conservadas sob refrigeração na temperatura de 4±1°C. A ativação dos microrganismos fúngicos para os ensaios quantitativos e qualitativos enzimáticos e de fermentação foi realizada em BDA (Agar Dextrose Batata) (Acumedia), durante 4 dias de crescimento, na temperatura de 28°C, em estufa bacteriológica.

4.5 Ensaio Qualitativo: *Screening* para Atividade Enzimática

A primeira fase do trabalho foi a realização de ensaios qualitativos em meios de culturas indutores em placas de Petri para a seleção de microrganismos produtores de lipase, celulase e protease. A Metodologia incluiu o preparo do inóculo e a seleção ou *screening* das enzimas.

4.5.1 *Preparo do Inóculo*

Os dezenove isolados de fungos filamentosos foram submetidos a ensaios qualitativos. O processo se inicia com a tomada de discos de 5 mm de diâmetro, removidos das bordas de colônias, previamente crescidas por 4 dias em meio BDA (Acumedia), seguido

da transferência desse material para placas de Petri, as quais continham os meios específicos para a detecção de produção das enzimas em estudo.

4.5.1.1 Screening para a Produção de Lipase

Para detecção de lipases utilizou-se o meio de cultura descrito por Colen (2006), constituído de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5%; (NH_2) CO 0,2%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1%; NaCl 0,1%; sais biliares 0,2%; extrato de levedura 0,05%; ágar 1,5%; óleo de oliva 1%. As placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica, a 28°C por 72 h, e a produção da enzima foi evidenciada pela formação de uma zona clara em torno colônias. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.5.1.2 Screening para a Produção de Celulase

Para detecção de celulasas foi utilizado o meio de cultura YNB (Levedura Nitrogênio Base) (Difco), suplementado com ágar 2% e carboximetilcelulose 1%. As placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica, a 28°C por 72 h, e a produção da enzima foi evidenciada pela formação de uma zona clara em torno colônias após revelação, pela adição de solução de vermelho congo 0,05%, lavado em seguida com solução NaCl 1M. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.5.1.3 Screening para a Produção de Protease

A produção de protease foi investigada com o objetivo de avaliar se essa enzima teria ação inibidora na produção de celulase e lipase, visto que alguns estudos indicam que a produção de proteases em fermentações por um determinado microrganismo, pode afetar a ação de outras enzimas (AHAMED *et al.*, 2005; O'DONNELL *et al.*, 2001; AHAMED e VERMETTE, 2008; LI, *et al.*, 2008).

Para a detecção de proteases utilizou-se o meio de cultura YM (malte e extrato de levedura) modificado, constituído de peptona 0,5%; extrato de levedura 0,3%; glicose 0,1%; extrato de malte 0,3%; ágar 1,5%; adicionado de 2,5% do meio de cultura *Skim Milk*

(Himedia). As placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica, a 28°C por 72 h, e a produção da enzima foi evidenciada pela formação de uma zona clara em torno colônias. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.6 Ensaio Quantitativo: Produção de Enzimas

Os ensaios quantitativos incluem a produção das enzimas em meios de cultura líquidos e a avaliação da atividade enzimática.

4.6.1 Produção de Lipase

Os dezenove isolados de fungos filamentosos foram submetidos aos ensaios quantitativos de produção de lipases. Dois discos de micélio de 5 mm de diâmetro, removidos das bordas de colônias crescidas por 4 dias em meio BDA (Acumedia), foram inoculados em frascos de vidro de 50 ml, contendo 10mL do meio de cultura líquido de indução. Para a produção de lipases dois tipos de meios de culturas diferenciados pelo tipo de óleo foram utilizados: meio mineral descrito por Gomide (2012), constituído de NH_4NO_3 0,1%; KH_2PO_4 0,1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%; Peptona 2,0%; adicionados ou de óleo de oliva 1% (v/v) ou de óleo da polpa da Macaúba 1% (v/v). Os frascos foram incubados a 28°C na rotação de 160 rpm por até 7 dias. Alíquotas de 200µl foram retiradas em intervalos de 24 horas e centrifugadas a 21.475 xg por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi conservado em -20°C para realização dos ensaios quantitativos de atividade enzimática até o dia posterior. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.6.2 Produção de Celulase

O objetivo do trabalho foi avaliar a produção de isolados produtores de lipase e celulase, logo os cinco microrganismos positivos nos ensaios quantitativos para produção lipase, nos meios de cultura com 1% de óleo de Macaúba (*Cladosporium cladosporonoides* M19, *Fusarium proliferatum* M62, *Penicillium* sp. M89, *Fusarium* sp. M184, *Fusarium* sp. M233), foram submetidos aos ensaios para detecção quantitativa de celulase. Seis discos de

micélio de 5 mm de diâmetro, removidos das bordas de colônias crescidas por 4 dias em meio YNB (Nitrogênio Levedura Base) (Difco), acrescido de ágar 2% e suplementado com carboximetilcelulose 1%, foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100mL do meio líquido de indução. No ensaio para produção de celulase, utilizou-se o meio mineral modificado, constituído de NH_4NO_3 0,1%; KH_2PO_4 0,1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%; extrato de levedura 1%; suplementado com carboximetilcelulose 1%. Os frascos foram incubados a 28°C na rotação de 160 rpm por até 4 dias. Alíquotas de 1mL foram retiradas em intervalos de 24 horas, e centrifugadas a 21.475 xg por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi conservado em -20°C para realização dos ensaios quantitativos de atividade enzimática até o dia posterior. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.6.3 Produção de Protease

Para detecção da produção de protease os cinco isolados de fungos filamentosos, positivos para produção de lipase e celulase (*Cladosporium cladosporonoides* M19, *Fusarium proliferatum* M62, *Penicillium* sp. M89, *Fusarium* sp. M184, *Fusarium* sp. M233), foram submetidos aos ensaios quantitativos de produção de protease. Dois discos de micélio de 5 mm de diâmetro, removidos das bordas de colônias crescidas por 4 dias em meio BDA (Acumedia), foram inoculados em frascos de vidro de 50 ml, contendo 10mL do meio de cultura líquido de indução YCB (Carbono Levedura Base) (Difco), suplementado com 0,01 % caseína e 0,1 % glicose. Os frascos foram incubados a 28°C na rotação de 160 rpm por até 7 dias. Alíquotas de 200µl foram retiradas em intervalos de 24 horas e centrifugadas a 21.475 xg por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi conservado em -20°C para realização dos ensaios quantitativos de atividade enzimática até o dia posterior. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.7 Atividade Enzimática

4.7.1 Determinação da Atividade Lipolítica

A determinação da atividade da lipase foi realizada de acordo com metodologia descrita por Winkler e Stuckmann (1979), utilizando-se p-nitrofenil palmitato (pNPP) (Sigma-Aldrich) como substrato.

A atividade enzimática foi avaliada pela reação de hidrólise catalisada pela enzima com o substrato sintético 4-nitrofenil palmitato. Esse composto é hidrolisado na ligação éster, mais susceptível a ação da enzima, liberando o composto 4-nitrofenol, de coloração amarela (Figura 12).

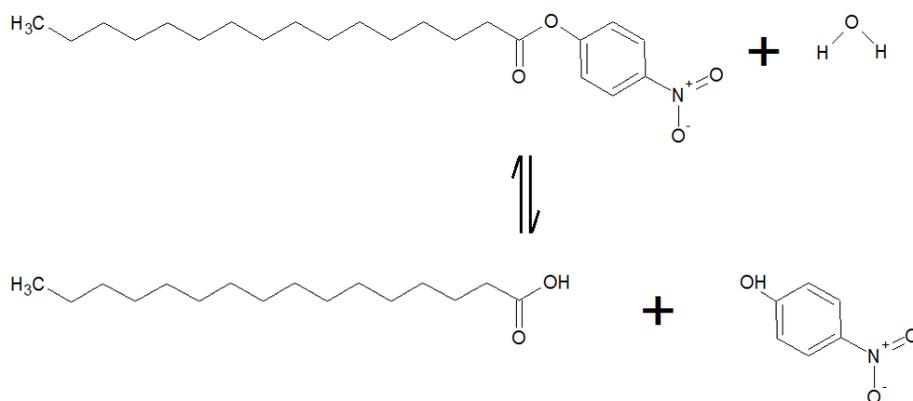


Figura 12- Reação de hidrólise do 4-nitrofenil palmitato (pNPP). Uma molécula pNPP tem sua ligação éster hidrolisada, gerando ácido palmítico e pNP, cuja absorção é lida em 410nm.

Preparam-se duas soluções. Uma primeira denominada solução A, por meio da dissolução de 90,0mg de pNPP (Sigma-Aldrich) em 30,0mL de isopropanol e; uma segunda solução B, adicionando-se 9,0g de triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 0,90g de goma arábica em 450mL de tampão Tris-HCl 0,09 mol.L⁻¹, solução previamente ajustada para o pH 8,0. As soluções A e B foram misturadas para formar uma nova solução, solução C, que foi preparada no momento do uso para a realização dos testes cinéticos. O preparo dessa solução C incluiu a adição lenta de 1 unidade volumétrica de solução A, juntamente com 9 unidades

volumétricas da solução B, sob agitação vigorosa e constante, preferencialmente à temperatura ambiente. Para o teste cinético, adicionou-se de 9 unidades volumétricas da solução C para uma unidade volumétrica da amostra a ser testada.

Os ensaios de quantificação foram realizados em microplacas de 96 poços, onde ocorreram as reações enzimáticas. A mistura de reação, constituída de 20 µL do sobrenadante da cultura dos fungos filamentosos e 180 µL da solução C (substrato). Para os testes cinéticos foi utilizado o leitor de microplacas para teste de ELISA (*Thermo Scientific MultiSkan Spectrum*) através de leituras no espectrofotômetro na faixa de 410nm e a 37°C, durante 10 min.

Os dados foram analisados por regressão linear quando o tempo de reação proporcionava uma reta de ajuste dos dados de atividade com um coeficiente de determinação $R^2 > 0,99$. Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como sendo a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 µmol de pNP por minuto a 37°C em pH 8,0. Foi considerado um coeficiente de absorção molar do pNP igual a $1,275 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ em pH 8,0 para cálculo da atividade Os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata.

4.7.2 Determinação da Atividade Celulotítica

Foi baseada no protocolo de Xiao *et al.*, (2004) com modificações, empregando-se papel de filtro como substrato e avaliando-se a atividade pela liberação de açúcar redutores, dosadas mediante o método de Miller (1959), empregando o ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS).

O reativo DNS foi preparado da seguinte forma: dissolveu-se 7,6 g de ácido 3-5 dinitrosalicílico ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$) (Sigma-Aldrich), em 500 mL de água tipo II; adicionou-se 13,2 g de hidróxido de sódio (NaOH) dissolvido em 200 mL de água tipo II. Em seguida, após completa dissolução do ácido 3-5 dinitrosalicílico e do hidróxido de sódio, adicionou-se lentamente 204g de tartarato duplo de sódio e potássio ($(\text{CHOH})_2\text{COONaCOOK}$) (Vetec). Por fim, completou-se o volume para 1L com água destilada. O reagente foi armazenado em frasco escuro na temperatura ambiente.

Soluções estoques foram preparadas de metabissulfito de sódio 35% e fenol 50% e foram adicionadas ao reativo de DNS, no momento que a reação de atividade enzimática foi

realizada, sendo que, para a proporção de 50 mL de solução do reagente do DNS, utilizou-se 533 µL de solução estoque de metabissulfito de sódio 35% e 506 µL de solução estoque de fenol 50%.

Os ensaios de quantificação foram realizados em microplacas de 96 poços de PCR, onde ocorreram as reações enzimáticas. A mistura de reação foi constituída de disco de 5 mm papel Whatman nº 1 (substrato); 33,3 µl de tampão acetato de sódio 0,5M, pH 4,8 e; 16,7µl do sobrenadante da cultura dos fungos filamentosos. Para o branco da amostra procedeu-se da mesma forma, porém sem o substrato. Após incubação a 50°C, durante 60 minutos em termociclador Applied Biosystems, 100 µl do DNS foram adicionados e as amostras foram novamente incubadas a 95°C, durante 5 min, e resfriadas a 4°C, durante 15 min. Em seguida, a absorbância do sobrenadante foi determinada a 540nm, em leitor de microplacas (Varioskan Flash).

Uma curva-padrão de glicose foi construída com as leituras da absorbância das soluções de glicose nas concentrações de zero a 3,0mg/mL. Uma unidade de atividade de celulase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de glicose sob as condições descritas. Os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata

4.7.3 Determinação da Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica expressa a ação da enzima sobre um substrato proteico. A atividade da protease foi realizada conforme Charney e Tomarelli (1947), que se baseia na formação de derivados corados em meio alcalino, a partir da digestão de uma solução de azocaseína.

Os ensaios de quantificação foram realizados em microplacas de 96 poços, onde ocorreram as reações enzimáticas. A mistura de reação foi constituída por 20 µl de solução azocaseína (Sigma-Aldrich) 1%, em tampão Tris HCl 0,2M, pH 7,5, adicionada de 40 µl de tampão Tris HCl 0,2M pH 7,5 e 20µl do sobrenadante da cultura dos fungos filamentosos. Após incubação a 37°C durante 30 minutos da reação, 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 10% m/v foram adicionados e as misturas foram novamente incubadas a 4°C durante 10 min. As amostras foram centrifugadas a 1.170g durante 15 min, 100 µl de sobrenadante obtido foram transferidos para outra microplaca contendo 100 µl de NaOH (1 M). A

quantidade de protease foi determinada por espectrofotometria a 450 nm. Para cada amostra enzimática preparou-se um branco, misturando, nesta ordem, enzima, TCA e substrato azocaseína.

Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade da enzima necessária para produzir um aumento na absorbância igual a 0,01 por minuto de reação, nas condições de ensaio. Os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata.

4.8 Obtenção e Preparo da Torta da Polpa da Macaúba

Após o descascamento dos frutos da Macaúba, estes foram despulpados e a polpa embalada em sacos plásticos e congelada para a manutenção da qualidade até se proceder a secagem. De acordo com o manual da prensa *expeller*, para o início do processo de extração deve ser certificado que o material prensado esteja dentro do faixa ideal de 4% a 12%, sendo que essa faixa pode variar para mais ou para menos e deve ser definido para cada matéria prima oleaginosa. Sendo assim, foi feita secagem em estufa de circulação forçada, a 60°C, por 48 horas, até atingir um teor de umidade próximo a 4%. Após a secagem o material foi triturado em liquidificador industrial e sequencialmente prensando para a extração do óleo e obtenção da torta utilizada no presente estudo.

As tortas obtidas foram conservadas em sacos plásticos em freezer a -4°C até sua utilização (Figura 13). O lote de torta de polpa obtido apresentou 30% de óleo de Macaúba. Para atingir o teor de 20%, o qual foi utilizado nos ensaios de fermentação, o lote foi dividido em três partes, sendo uma das partes submetida a extração de óleo completa em aparelho soxhlet por 12h, utilizando hexano como solvente. Posteriormente à extração, a torta livre de lipídios foi mantida em capela química por aproximadamente 10 horas, com a finalidade de evaporar o solvente remanescente contido na torta. Em seguida, uma parte da torta desengordurada foi misturada a 2 partes da torta sem tratamento (com óleo) para obtenção de um valor aproximado de 20% de teor de óleo. A torta resultante foi utilizada para as análises de caracterização da torta e fermentação para a produção das enzimas deste estudo.



Figura 13-Polpa e Torta de Macaúba

Fonte: Arquivo pessoal

4.8.1 Caracterização Química da Torta da Polpa da Macaúba

A caracterização química da torta foi realizada através da determinação dos teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídios totais, carboidratos totais, lignina, hemicelulose e celulose conforme descritos nos itens a seguir.

4.8.1.1 Teor de Umidade e Voláteis

O teor de umidade e voláteis foi determinado de acordo com método AOCS Ac 2-41 (“*Moisture and Volatile Matter*”) (AOCS, 2011). Para tanto, foram pesados 10,0g de amostra, em triplicata, em placas de Petri, previamente desumidificadas em estufa a 105°C. As amostras foram mantidas em estufa a 130°C por 3 horas. O ensaio foi realizado em triplicata. O resultado foi calculado segundo a equação 1, sendo expresso em porcentagem de umidade.

$$\text{Umidade e voláteis, \%} = \frac{\text{perda de massa,g}}{\text{massa da porção de teste,g}} \times 100 \quad (1)$$

4.8.1.2 Teor de Óleo

Foi realizado segundo método da AOCS Bc 3-49 (“*Oil*”) (AOCS, 2011). Cerca de 2,0g de amostra foi transferida para cartuchos de papel de filtro qualitativo. Em seguida

foram colocados em aparelho extrator Soxhlet, sendo os lipídeos extraídos com éter de petróleo, por aproximadamente 6 horas, e coletados em balões de fundo chato de 250mL, previamente desumidificados a 105°C e com massa conhecida. Posteriormente à extração, os balões contendo os lipídios foram mantidos em estufa a 105°C por aproximadamente uma hora, com a finalidade de evaporar o solvente remanescente contido no óleo. Após esta etapa os balões foram resfriados em dessecador até temperatura ambiente e pesados. O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de óleo em base seca e calculados segundo a equação 2.

$$\text{óleo}\% = \frac{\text{Massa do óleo}(g)}{\text{Massa da amostra}(g)} \times 100 \quad (2)$$

4.8.1.3 Teor de Acidez da Polpa

A determinação da acidez da polpa foi realizada segundo método Adolfo Lutz 310/IV (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008). Cerca de 5,0 g da torta da polpa da Macaúba foram pesados em Erlenmeyer de 250 mL, a amostra foi diluída em aproximadamente 100 mL de água e logo após foi realizada a adição de 0,3 mL de solução de fenolftaleína para cada 100 mL da solução a ser titulada. A solução foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1 M sob agitação constante, até coloração rósea persistente por 30 segundos. Os cálculos foram realizados segundo equação 3 e expressos em acidez em ml de NaOH/100g de amostra.

$$\text{Acidez titulável}\% = \frac{V \times f \times M \times 100}{P} \quad (3)$$

V = nº de mL da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

P = massa da amostra em g ou volume pipetado em mL

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio

4.8.1.4 Proteínas

O teor de proteína foi quantificado pelo método Kjeldal (Kjeldahl, 1883; IAL, 2008). Inicialmente, adicionou-se em um tubo de vidro para bloco digestor, cerca de 0,5g de amostra, 600mg de sulfato de potássio, 10mL de ácido sulfúrico concentrado e 300mg de sulfato de cobre, seguido de digestão a 350°C. Após material contido no tubo apresentar-se límpido, foram adicionados 15 mL de hidróxido de sódio 50%. A mistura foi submetida à destilação em destilador de nitrogênio e o destilado coletado em frasco cônico de 250mL, contendo 15mL de solução saturada de ácido bórico e 3 gotas de solução indicadora vermelho de metila a 0,1%. Posteriormente, o destilado foi titulado com ácido clorídrico 0,02N e os resultados expressos em g/100g de material integral e calculados segundo a equação 4. O ensaio foi realizado em triplicata.

$$Proteína \% = \frac{V(HCl) * N(HCl) * 14 * 6.25}{\text{peso da amostra (mg)}} * 100 \quad (4)$$

Proteína % = teor de proteínas, em porcentagem

V(HCl) = Volume gasto de HCl na titulação

N(HCl) = Normalidade da solução de HCl

6,25 = Fator de conversão para nitrogênio protéico

14 = n° de massa atômica do nitrogênio

4.8.1.5 Carboidratos Totais, Hemicelulose e Celulose

A análise de carboidratos totais, hemicelulose e celulose foram realizadas pelo Laboratório de Celulose e Papel do Departamento de Engenharia Floresta da Universidade Federal de Viçosa, conforme o procedimento descrito por Wallis *et al.*, 1996.

Para hidrólise do material, utilizou-se 300 ± 10 mg da torta em um becker, em seguida foram adicionados 3 ml de ácido sulfúrico a 72%. Agitou-se o conteúdo com uma vareta de vidro, até dissolução do material em seguida o becker contendo a amostra foi colocado em banho a $30 \pm 0,5$ °C durante 1 h. Posteriormente, foram adicionados 84 ml de água no becker contendo a amostra e este foi tampado com uma folha de alumínio e colocado em uma

autoclave a 120 ± 5 °C durante 1 h. Após, a amostra contida no becker foi transferida para um balão volumétrico de 250 ml, após resfriamento a temperatura ambiente completou-se o volume com água. A determinação de sacarídeos foi realizada por cromatografia líquida de alto desempenho, utilizando equipamento DIONEX, equipado com detector PAD (*pulse amperometric detector*), coluna CarboPac PA1 (4x250 mm) e como fase móvel, água deionizada e hidróxido de sódio 0,3 mol/l e 0,1 mol/l.

4.8.1.6 Lignina

A análise de lignina foi realizada pelo Laboratório de Celulose e Papel do Departamento de Engenharia Floresta da Universidade Federal de Viçosa. O teor de lignina insolúvel foi determinado pelo procedimento TAPPI T222 om-88 (TAPPI Useful Methods, 1993), e o teor de lignina solúvel em ácido pelo método TAPPI UM 250 (TAPPI Useful Methods, 1993).

Em relação a lignina insolúvel, os carboidratos da amostra foram hidrolisados e solubilizados por ácido sulfúrico; a lignina insolúvel em ácido foi filtrada, seca e pesada. Para esta determinação, adicionou-se 40,0 ml de ácido sulfúrico 72% em um becker contendo 10g da amostra de torta. O recipiente foi mantido em um banho a 2 ± 1 °C durante a dispersão do material. Após a dispersão da amostra, o Becker foi coberto com um vidro de relógio e mantido em um banho a 20 ± 1 °C durante 2 horas, formando diversos oligossacarídeos, os quais são hidrolisados numa segunda etapa com ácido sulfúrico diluído a 3%, a 100 °C, por 4 horas. Após esta sequência de hidrólises, resultou-se em um resíduo que, após lavagem com água quente, foi determinado, gravimetricamente, como lignina insolúvel em ácido (de acordo com norma TAPPI T222 om-98).

Em seguida, foi feita a determinação do Teor de Lignina Solúvel (Norma TAPPI 250 UM). Neste procedimento a lignina solúvel em ácido é determinada por meio da absorbância na região do ultravioleta, no comprimento de onda de 205 nm, do filtrado obtido no isolamento da lignina insolúvel (procedimento anterior). O nível de absorbância esta correlacionado ao conteúdo de lignina solúvel presente no filtrado.

4.9 Ensaios Preliminares para a Otimização da Fermentação

Os cinco isolados positivos para produção de lipase em óleo de Macaúba 1% (*Cladosporium Cladosporinoides* M19, *Fusarium proliferatum* M62, *Penicillium* sp. M89, *Fusarium* sp. M184, *Fusarium* sp. M233) foram avaliados quanto à produção de lipase em diferentes concentrações de óleo de Macaúba, para a investigação da influência deste fator na produção de lipases.

Adicionalmente, os isolados foram avaliados quanto à produção de lipase, celulase e protease em diferentes concentrações de torta de Macaúba, para investigação da influência deste fator na produção das lipases e celulases e a influência da produção de proteases na produção de lipase e celulase.

4.9.1.1 Influência da Concentração do Óleo da Macaúba na Produção de Lipase

Dois discos de micélio de 5 mm de diâmetro, removidos das bordas de colônias crescidas por 4 dias em meio BDA (Acumedia), foram inoculados em frascos de vidro de 50 ml, contendo 10mL do meio de cultura líquido de indução, meio mineral descrito por Gomide (2012) (NH_4NO_3 0,1%; KH_4PO_4 0,1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%; Peptona 2,0%) adicionado de óleo da polpa da Macaúba nas concentrações 0,75%, 1,5 % e 3%. Os frascos foram incubados a 28°C na rotação de 160 rpm por até 7 dias. Alíquotas de 500µl foram retiradas em intervalos de 24 horas e centrifugadas a 21.475 xg por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi conservado em -20°C para realização dos ensaios quantitativos de atividade enzimática das lipases até o dia posterior, segundo método descrito no item 4.7.1. O ensaio foi realizado em duplicata.

4.9.1.2 Influência da Concentração da Torta da Macaúba na Produção de Lipase, Celulase e Protease

Seis discos de micélio de 5 mm de diâmetro removidos das bordas de colônias crescidas por 4 dias em meio BDA (Acumedia), foram inoculados em frascos erlenmeyer de 250 ml, contendo 50mL do meio de fermentação (água tipo II e NH_4NO_3 0,1%), adicionado

de diferentes concentrações da torta da polpa da Macaúba de 1,75%, 3,75%, 7,5% e 15%, que correspondem às respectivas concentrações de óleo 0,35%, 0,75%, 1,5% e 3%. Os frascos foram incubados a 28°C na rotação de 160 rpm por até 14 dias. Alíquotas de 1mL foram retiradas em intervalos de 48h horas e centrifugadas a 21.475 xg por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi conservado em -20°C para realização dos ensaios quantitativos de atividade enzimática das lipases, celulasas e proteases até o dia posterior, segundo os métodos descritos nos itens **4.7.1**, **4.7.2** e **4.7.3**. O ensaio foi realizado em duplicata.

4.10 Otimização da Fermentação

O isolado que apresentou o melhor resultado de produção simultânea de lipase e celulase foi objeto de estudos de otimização da fermentação, utilizando a torta de Macaúba como substrato.

4.10.1 Delineamento Fatorial Fracionado Misto L12

O experimento de otimização seguiu o delineamento fatorial fracionado misto, que consiste de parte das combinações de tratamentos de uma repetição completa. Esse delineamento é principalmente utilizado na realização de experimentos pilotos (*screening experiments*), que são experimentos com muitos fatores, tendo o propósito de identificar aqueles com efeito significativo sobre a resposta desejada. Geralmente são realizados numa etapa anterior ao experimento definitivo. Os fatores identificados com efeito significativo são então estudados num experimento mais completo.

O meio fermentativo foi composto de água tipo II, torta de Macaúba e uma fonte de nitrogênio. No estudo foram utilizados valores variáveis da concentração da torta de Macaúba, concentração e tipo de fonte de nitrogênio (ureia, extrato de levedura, nitrato de amônio), pH e temperatura, de acordo níveis reportados na literatura como indutores de produção de lipase e celulase de microrganismos (VARGAS, *et al.*, 2008; SILVA, 2012; SANTOS, 2013; FEITOSA e FELBER, 2010; OLIVEIRA, *et al.*, 2014). Assim, foram avaliadas 4 variáveis com 2 níveis cada e 1 variável com 3 níveis. No trabalho foi utilizado o software Minitab 16 (MINITAB, 2010), que resultou em um planejamento de 12 experimentos.

A preparação dos meios de cultura foi feita seguindo as orientações do planejamento fatorial fracionado misto da Tabela 5 (variáveis não codificadas) e Tabela 6 (variáveis codificadas), de forma aleatorizada.

Inicialmente adicionou-se água em frascos Erlenmeyer de 250mL e, em seguida, os volumes da torta de Macaúba e a fonte de nitrogênio NH_4NO_3 de acordo com as proporções estabelecidas para o delineamento, totalizando 50 ml de meio fermentativo. Após essa etapa, foi aferido o pH da solução, que quando necessário foi corrigido por meio da adição de solução HCl/NaOH 5M. Todos os frascos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Para o preparo do inoculo adicionou-se 5 discos do isolado *Penicillium* sp. M89 nos frascos Erlenmeyer de 250mL com o meio fermentativo. Os frascos foram inoculados sob agitação orbital a 180rpm durante 12 dias nas temperaturas de 25°C e 35°C. Alíquotas de 2mL foram retiradas em intervalos estabelecidos e centrifugadas a 21.475 xg por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi conservado em -20°C para realização dos ensaios quantitativos de atividade enzimática das lipases e celulasas até o dia posterior, segundo os métodos descritos nos itens 4.7.1 e 4.7.2.

Para análise do delineamento fatorial fracionado misto, os fatores de resposta trabalhados foram a atividade lipolítica e celulásica no tempo de 12 dias, buscando-se os maiores valores de atividade simultânea das duas enzimas em estudo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 5: Valores não codificados dos níveis de cada fator avaliado no delineamento fatorial misto L12.

Fontes de Variação		Níveis Testados	
[Torta Macaúba] (%)	5%		10%
Fonte de Nitrogênio	Ureia	Nitrato de Amônio	Extrato de Levedura
[N] (%)	0,2		2
pH	5		8
Temperatura	25°C		35°C

*[]: concentração; N: nitrogênio

Tabela 6: Valores codificados dos níveis de cada fator avaliado no delineamento fatorial misto fracionado L12.

Ensaio	[Torta de Macaúba]	Fonte de Nitrogênio ^(*)	[N]	PH	Temperatura
1	2	a	1	1	1
2	2	a	1	2	2
3	1	a	2	2	1
4	1	a	2	1	2
5	1	b	1	1	1
6	2	b	1	2	1
7	1	b	2	1	2
8	2	b	2	2	2
9	1	c	1	2	2
10	2	c	1	1	2
11	1	c	2	2	1
12	2	c	2	1	1

*a- ureia, b- nitrato de amônio c- extrato de levedura; []: concentração; N: nitrogênio; 1=valor mínimo e 2= valor máximo, de acordo com a Tabela 5 de valores não codificados.

A análise de variância (ANOVA) foi feita utilizando o software Minitab 16 (MINITAB, 2010), no nível de 0,05 de significância estatística, de forma a determinar os modelos de melhor ajuste.

A partir dos resultados da ANOVA para os experimentos do fatorial completo, um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado para otimizar ou verificar uma tendência ótima do processo enzimático.

4.10.2 Delineamento Composto Central Rotacionado

Visando obter a condição ótima de produção enzimática, foi aplicado um modelo estatístico de superfície resposta, do tipo composto central rotacionado (DCCR). No modelo com 6 repetições no ponto central e com 4 pontos axiais os fatores analisados foram a concentração da torta de Macaúba (fonte de carbono) e temperatura. Esses fatores foram

significativos para a produção de lipase e celulase, resultado obtido por meio do delineamento fatorial fracionado de níveis mistos L12. O modelo do delineamento pode ser visualizado na Tabela 7 (valores não codificados) e na Tabela 8 (valores codificados). Os valores não codificados foram obtidos por interpolação quadrática.

De acordo com os resultados encontrados no delineamento fracionado, estabeleceu-se como fonte de nitrogênio o extrato de levedura, bem como os fatores pH e concentração de nitrogênio foram mantidos nos valores de 5 e 2%, respectivamente.

Para o preparo do inóculo, adicionou-se 5 discos do isolado *Penicillium* sp. M89 em frascos Erlenmeyer de 250mL adicionados de água tipo II e torta de Macaúba nas concentrações 2,5%, 5%, 7,5%, 10% e 12,5%, totalizando o volume de 50 ml. Na sequência adicionou-se a fonte de nitrogênio extrato de levedura a 2% e o pH foi ajustado para 5. Os frascos foram inoculados sob agitação orbital a 180rpm durante 12 dias nas temperaturas de 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 40°C. As amostras foram centrifugadas a 21.475 xg por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi conservado em -20°C para realização dos ensaios quantitativos de atividade enzimática das lipases e celulasas e das proteínas totais produzidas até o dia posterior, segundo os métodos descritos nos itens [4.7.1](#), [4.7.2](#) e [4.10.2.1](#) respectivamente. O precipitado contendo micélio e o resíduo foi conservado em -20°C para quantificação do crescimento celular por dosagem de ergosterol conforme item [4.10.2.2](#). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os fatores de resposta trabalhados para DCCR utilizado foram a atividade lipolítica e celulásica ($U mL^{-1}$, $U mg^{-1}$ total de proteína e $U g^{-1}$ de biomassa) e crescimento celular (biomassa).

Tabela 7: Valores não codificados dos níveis de cada fator avaliado no DCCR.

Ensaio	[Torta Macaúba%]	Temperatura (°C)
1	12,5	25
2	7,5	20
3	7,5	25
4	2,5	25
5	7,5	25
6	7,5	25
7	7,5	40

8	7,5	25
9	5	35
10	5	25
11	10	25
12	10	35
13	7,5	25

*[]: concentração

Tabela 8: Valores codificados dos níveis de cada fator avaliado no DCCR

Ensaio	[Torta Macaúba]	Temperatura
1	1,41	0
2	0	-1,41
3	0	0
4	-1,41	0
5	0	0
6	0	0
7	0	1,41
8	0	0
9	-1	-1
10	-1	1
11	1	1
12	1	-1
13	0	0

*[]: concentração; -1,41, -1, 0, 1 e 1,41 de acordo com os valores da Tabela 7.

Para se otimizar processos com muitas variáveis resposta, define-se a função desejabilidade (d), que procura fornecer os valores das variáveis independentes (X_i) que resultam nas respostas mais desejáveis (Myers et al., 2009). Para cada resposta $Y_i(X)$ uma função $d_i(Y_i)$ multiplica a função $Y_i(X)$ por valores entre 0 (valor totalmente indesejável para a função $Y_i(X)$) e 1 (valor totalmente desejável para a função $Y_i(X)$). Pode-se combinar os valores das funções de desejabilidade utilizando-se uma média geométrica, permitindo selecionar valores das variáveis independentes que proporcionam valores ótimos de todas as respostas simultaneamente. A função resultante é denominada desejabilidade total (D), calculada segundo a Equação 5.

$$D = [d_i(Y_i) \times d_j(Y_j) \dots d_k(Y_k)]^{\frac{1}{k}} \quad (5)$$

onde k expressa o número de respostas.

4.10.2.1 Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford

A quantificação de proteínas totais foi realizada dos sobrenadantes resultantes do experimento do DCCR pelo método de Bradford (1976). Esse método baseia-se na interação entre o corante Coomassie Brilliant Blue G 250 e macromoléculas de proteínas, que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre proteína de alta massa molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve em 595 nm. O cálculo para a dosagem de proteínas foi realizado a partir de uma curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina (Sigma-Aldrich) na faixa de 0 a 150µg/mL.

A quantificação do teor de proteínas totais pelo método de Bradford foi realizada em microplacas de 96 poços. A cada poço foram adicionados 180µL de Reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) e 20µL do sobrenadante a ser dosado. A preparação foi incubada por 5 minutos, na temperatura ambiente ao abrigo da luz. Os valores das absorbâncias foram determinados a 595nm em um leitor de microplaca (Varioskan Flash).

4.10.2.2 Avaliação do Crescimento pela Dosagem de Ergosterol Associado a Biomassa Fúngica

A biomassa fúngica foi quantificada de forma indireta pela determinação do teor de ergosterol associado a bicamada de fosfolípídeo da membrana celular do fungo, devido à impossibilidade de separar eficientemente a biomassa da matriz do substrato para quantificá-la por métodos gravimétricos (PANDEY *et al.*, 2001). A extração e dosagem de ergosterol foi realizada conforme procedimento descrito por Montgomery *et al.*, (2000) com adaptações. Os precipitados resultantes da centrifugação de meio fermentativo do cultivo submerso foram liofilizados por 12h para dosagem do ergosterol. Cerca de 300 mg (massa seca) foram transferidos para tubos de ensaio, os quais foram adicionados de 2,0mL de NaOH 2 molL⁻¹ para promover a saponificação da membrana celular. Após 30 minutos,

adicionaram-se 2,0mL de metanol 100%. O tubo foi lacrado com filme de PVC e colocado dentro de um recipiente plástico fechado. O recipiente foi submetido a uma irradiação de 460 W por 20 segundos em um forno de microondas doméstico. Após resfriamento por cerca de 15 minutos, o procedimento foi repetido por mais 10 segundos. Após resfriamento, o material contido no tubo foi, então, neutralizado com 1,0 mL de HCl 2 molL⁻¹ e tratado com 2,0mL de metanol 100%. A esta mistura final, foram adicionados 2,0mL de pentano e, em seguida, o tubo foi agitado em vortex. O volume de sobrenadante foi coletado com o auxílio de uma pipeta e o procedimento foi repetido por mais duas vezes. O volume total de pentano coletado, foi evaporado por cerca de 24 horas.

A análise dos extratos foi realizada em HPLC Shimadzu, utilizou uma coluna de fase reversa C18 Nova Pak de 15cm de comprimento e 3,9mm de diâmetro eluída com metanol 98% como fase móvel a um fluxo de 1mL/min a 30°C. Foi utilizado um detector UV operando em um comprimento de onda de 282nm. A concentração de ergosterol presente na amostra foi determinada através de uma curva de calibração construída com solução padrão de ergosterol PA (Sigma-Aldrich) em etanol nas concentrações de 10, 25, 50, 100, 250, 500 1000 e 2000µgmL⁻¹. O tempo de retenção obtido foi de 4,22 minutos.

A correlação entre o conteúdo de ergosterol e biomassa fúngica foi determinada utilizando a biomassa micelial do isolado *Penicillium* sp. M89 cultivado em caldo malte 2% por 3, 6, 10, 14 e 18 dias, a 25°C, no escuro sem agitação. A massa micelial foi coletada por filtração congelada a -80°C e liofilizada até peso constante. Cerca de 50mg de massa micelial foi submetida ao mesmo processo de extração de ergosterol descrito acima.

4.11 Caracterização Bioquímica e Cinética das lipases e celulases produzidas

4.11.1 Caracterização da Atividade Lipolítica do Extrato Bruto Frente a Diferentes p-fenil Ésteres de Ácidos Graxos.

Para avaliar a especificidade da lipase frente aos diferentes ésteres de 4-nitrofenil, ensaios de atividade lipolítica foram conduzidos conforme item **4.7.1**, utilizando os ésteres 4-nitrofenil acetato, 4-nitrofenil butirato, 4-nitrofenil octanoato, 4-nitrofenil decanoato, 4-nitrofenil laurato, 4-nitrofenil miristato e 4-nitrofenil palmitato. Foram preparadas diferentes

soluções estoques A, dissolvendo 90,0mg dos diferentes ésteres de 4-nitrofenil em 30,0mL de isopropanol. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.11.2 Caracterização da Atividade Enzimática do Extrato Bruto Frente a Diferentes Temperaturas.

Para o estudo da temperatura ótima da enzima lipase foi preparada uma solução A de 4-nitrofenil palmitato em isopropanol e a solução C conforme o item **4.7.1**. Os testes cinéticos foram realizados no equipamento Varioskan Flash nas temperaturas de 20, 25, 30, 35, 45°C em microplacas de 96 poços. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Para a determinação da temperatura ótima da atividade enzimática da celulase, preparou-se a reação conforme o item **4.7.2**, sendo que a incubação foi feita nas temperaturas de, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70°C em termociclador *Applied Biosystems*. Após a reação, 100 µl do DNS foram adicionados e as amostras foram novamente incubadas a 95°C durante 5 min e resfriadas a 4°C durante 15 min. Em seguida a absorbância do sobrenadante foi determinada a 540nm, em leitor de microplacas (Varioskan Flash).

4.11.3 Caracterização da Atividade Enzimática do Extrato Bruto Frente a Diferentes Valores de pH.

Para a determinação do perfil de pH em função da atividade da lipase, foi utilizado a faixa de pH de 3,0-10,0, com os seguintes tampões (0,09 mol/L) incubados a 40°C: citrato-fosfato pH 3,0-7,0; Tris-HCl para pH 8,0- 9,0 e; Glicina para pH 10,0. Os ensaios de atividade foram realizados conforme o item 4.7.1, utilizando como substrato o 4-nitrofenil palmitato e preparando-se a solução B em diferentes valores de pH.

Para a determinação do perfil de pH em função da atividade da celulase, foi utilizada a faixa de pH de 3,0-10,0, com os seguintes tampões (0,05 mol/L): citrato-fosfato pH 3,0-7,0; Tris-HCl para pH 8,0- 9,0 e; Glicina para pH 10,0. Os ensaios de atividade foram realizados conforme o item **4.7.2**, na temperatura de incubação de 45°C.

4.12 Estatística

Os resultados dos experimentos e ensaios foram expressos em termos da média aritmética de duas ou três repetições de acordo com o experimento. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando o programa estatístico Minitab 16 (MINITAB, 2010) e Sisvar 5.3 (SISVAR, 1998), sendo que as médias aritméticas foram comparadas pelo teste de Tukey com o nível de significância de 0,05 (5%).

Para avaliar o efeito da produção de protease na produção de lipases e celulasas, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson, que mede o grau da correlação (e a direção dessa correlação - se positiva ou negativa) entre duas variáveis de escala métrica, com nível de significância de 0,05 por meio do programa Minitab 16 (MINITAB, 2010).

O teste t de Student ($\alpha = 0,05$) foi utilizado para se acessar a significância estatística dos efeitos dos fatores controláveis avaliados, no caso do delineamento fatorial fracionado de níveis mistos, e dos coeficientes dos modelos ajustados no caso do DCCR. O teste de Fisher (ANOVA da regressão) foi utilizado para a determinação e comparação da significância estatística dos modelos obtidos para cada resposta avaliada no DCCR. As análises estatísticas (delineamentos, e otimização) e a plotagem gráfica foram efetuadas nos programas Minitab 16 (MINITAB, 2010) e Sigma Plot 12.0 (SIGMA PLOT, 2004), respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do Potencial de Produção de Enzimas Hidrolíticas

Dezenove isolados de fungos filamentosos foram avaliados quanto ao seu potencial de produção e secreção das enzimas celulase, lipase e protease por meio de ensaios qualitativos em meio sólido. Resultados positivos foram evidenciados pela produção de halos translúcidos no entorno das colônias crescidas em meios específicos para cada enzima, conforme apresentado na Figura 14. Dos dezenove isolados, 4 (21,05%) foram positivos para a secreção de lipases utilizando o azeite de oliva como substrato, 13 isolados (68,42%) apresentaram atividade positiva para produção de celulase utilizando a carboximetilcelulose como substrato e 14 isolados (73,68%) para secreção de proteases quando cultivadas em ágar Skim milk conforme descrito na Tabela 9.

Tabela 9: Produção de lipase, celulase e protease por fungos filamentosos isolados de frutos da palmeira Macaúba evidenciada nos ensaios qualitativos

Isolados	Lipase	Celulase	Protease
M1	-	+	+
M8	-	-	+
M12	+	+	+
M19	-	+	+
M23	+	-	+
M26	-	-	+
M27	-	+	+
M29	-	+	+
M62	-	+	-
M70	-	+	-
M89	-	+	+
M109	-	+	+
M124	-	+	+
M162	-	-	+
M165	-	-	-
M184	+	+	-
M221	+	+	+
M233	-	+	-
M228	-	-	+

*(+) positivo; (-) negativo para produção das enzimas.

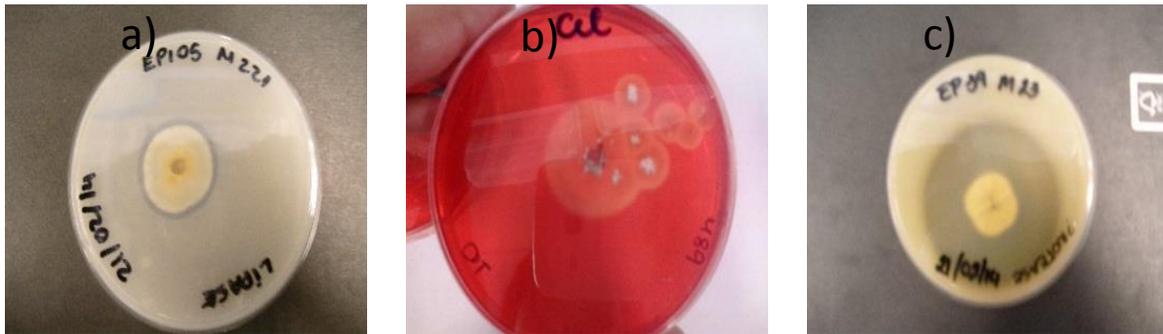


Figura 14- Halos formados pela degradação das enzimas nos respectivos substratos [a) lipase; b) celulase; c) protease].

A produção das enzimas lipase, celulase e protease por microrganismos isolados da casca e da polpa do fruto da Macaúba foram relatados por outros pesquisadores, porém sem a apresentação de gêneros ou espécies. Cambraia e colaboradores (2012) avaliaram a produção de enzimas hidrolíticas por 32 isolados de fungos filamentosos isolados de frutos de Macaúba com diferentes períodos de deposição no solo, sendo que dos isolados testados, 23 (71,87%) apresentaram produção de celulase, 9 (28,12%) de protease e nenhum apresentou produção de lipase. Oliveira e outros (2012) avaliaram a produção de lipase, protease e celulase por 94 bactérias isoladas dos frutos da Macaúba, destes, 27,66% apresentaram produção de celulase, 31,91% para protease e 9,57% para lipase. Adicionalmente Resende (2014) avaliou a produção de enzimas hidrolíticas por 529 leveduras isoladas da Macaúba, sendo que 65 (12%) apresentaram atividade para celulase, 35 (6,6%) para lipase e 29 (5,4%) para proteinases, sendo que para a produção de lipase os gêneros positivos foram: *Candida*, *Fellomyces*, *Meyerozyma*, *Sarocladium*. Para protease: *Candida*, *Eballistra*, *Meyerozyma*, *Occultifur*, *Ogataea*, *Sarocladium*, *Ustilago*. Para celulase: *Bandoniozyma*, *Bulleromyces*, *Candida*, *Hannaella*, *Hanseniaspora*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma*, *Meyerozyma*, *Sarocladium* e *Ustilago*.

5.1.1 Atividade da Lipase em Óleo de Oliva pelo Método Quantitativo

Nos ensaios de avaliação de produção de lipase em meio líquido suplementado com óleo de oliva 1%, foram observados resultados positivos para os isolados *Fusarium* sp. M233, *Fusarium* sp. M184, *Fusarium proliferatum* M62, sendo que a produção variou com o fungo e o tempo de cultivo em estudo conforme demonstra Figura 15. A produção de lipase iniciou-se no tempo de 48h para o isolado *Fusarium* sp. M184 e no tempo de 72h para os isolados *Fusarium* sp. M233 e *Fusarium proliferatum* M62.

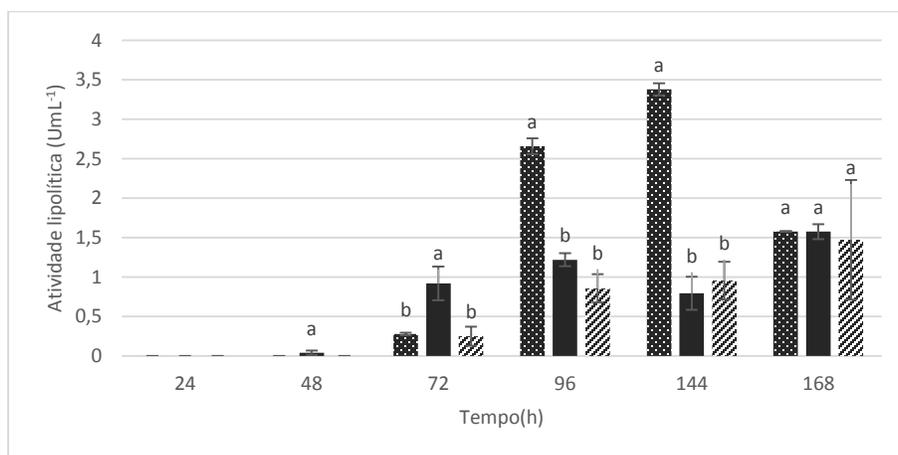


Figura 15- Atividade lipolítica de acordo com o tempo de cultivo em meio mineral suplementado com óleo de Oliva 1%. *Letras iguais em um mesmo tempo avaliado significam que não houve diferença estatística entre as médias. Letras diferentes significam que ocorreu diferença significativa ao nível de 5%. Legenda: ■ *F. proliferatum* M62; ■ *Fusarium* sp. M184; ▨ *Fusarium* sp. M233.

Os maiores valores foram observados para o isolado *Fusarium proliferatum* M62 (3,38 UmL⁻¹), com 144 horas de cultivo. Por sua vez, o isolado *Fusarium* sp. M233 apresentou as menores atividades enzimáticas, sendo a atividade máxima (1,47 UmL⁻¹) observada no tempo de 168h.

Os isolados *Fusarium* sp. M233 e *Fusarium proliferatum* M62, positivos neste ensaio quantitativo em meio de cultura líquido, apresentaram resultado negativo no ensaio qualitativo em meio de cultura sólido em placa para detecção de lipase. Este resultado sugere que estes isolados podem produzir lipases com maior habilidade de difusão no meio de cultura líquido, uma vez que a difusão da enzimas é influenciada pelo peso molecular da enzima, que pode a impedir de difundir pelo ágar e, dessa forma, não será formado halo de hidrólise no meio sólido, evidência de positividade para a produção da enzima (SILVA,

2011). Verificou-se também que os fungos com resultados positivos no ensaio qualitativo em meio de cultura sólido para detecção de lipase, M12, M23 e M221, apresentaram atividade negativa no ensaio quantitativo em meio de cultura líquido. Este resultado pode indicar que nestes isolados, as enzimas produzidas permanecem ligadas a parede celular, não sendo detectadas nos ensaios utilizando meio de cultura líquido, que avalia atividade de enzima extracelular (Pérez-de-Moura *et al.*, 2013). Outra possibilidade é que a condição de cultivo utilizada nos ensaios qualitativos e quantitativos não favoreceu a produção da enzima. Diversos estudos tem mostrado que a produção de lipases pode ser afetada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, pH do meio, agitação, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido no caso do bioprocessamento submerso (SHARMA, 2001; COLLA *et al.*, 2012; COLEN, 2006.). Ademais segundo Papagianni (2004), o sucesso na obtenção de um produto fúngico requer um conhecimento detalhado das características do crescimento e da fisiologia da cepa produtora, sendo cada fungo, único no seu desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico. As diferenças entre eles ocorrem devido a algum fator que ao interferir no seu desenvolvimento provoca alterações que se traduzem em diferentes respostas àquele fator e cada um responde diferentemente.

Os microrganismos positivos pelo método quantitativo para a produção de lipase pertencem ao gênero *Fusarium*, diversos estudos têm demonstrado a produção de lipases por isolados deste gênero. Hoshino e colaboradores (1992), reportaram a produção de lipase por *F. oxysporum* com atividade máxima de 10 UmL⁻¹. Maia e colaboradores (1999) descreveram uma atividade lipásica de 10,5 UmL⁻¹ para *F. solani* em meio contendo 3% (p/v) de peptona e 0,5% (v/v) de óleo de oliva.

5.1.2 Atividade de Lipase em Óleo de Macaúba pelo Método Quantitativo

Dos dezenove isolados analisados, cinco isolados, *Cladosporium cladosporonoides* M19, *Fusarium proliferatum* M62, *Penicillium* sp. M89, *Fusarium* sp. M184 e *Fusarium* sp. M233 foram positivos para a produção de lipase utilizando o óleo de Macaúba 1% como substrato nos tempos de cultivos analisados, conforme apresentado na Figura 16. Destaca-se que os isolados *Cladosporium cladosporonoides* M19 e *Penicillium* sp. M89 não apresentaram atividade durante o crescimento no meio contendo óleo de oliva como

substrato. Este resultado sugere que, comparativamente, o óleo de Macaúba apresenta outros componentes capazes de induzir a produção dessa enzima, lembrando que cada um destes óleos apresenta composição diferenciada de triacilglicerídeos.

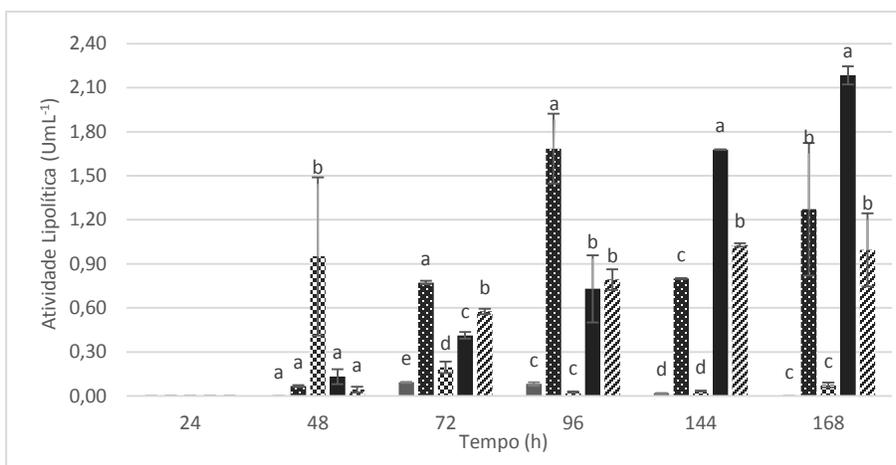


Figura 16- Atividade lipolítica de acordo com o tempo de cultivo em meio mineral suplementado com óleo de Macaúba 1%. *Letras iguais em um mesmo tempo significam que não houve diferença estatística entre as médias. Letras diferentes significam que ocorreu diferença significativa ao nível de 5%. Legenda: ■ *C. cladosporonoides* M19; ■ *F. proliferatum* M62; ▣ *Penicillium* sp. M89; ■ *Fusarium* sp. M184; ▨ *Fusarium* sp. M233.

Para os isolados *Fusarium proliferatum* M62, *Fusarium* sp. M184 e *Fusarium* sp. M233, a produção de lipase foi maior nas fermentações suplementadas com óleo de oliva 1% quando comparadas àquelas com o óleo de Macaúba 1%. Estes resultados podem estar relacionados com a ação específica de lipases sobre triacilglicerídeos de cadeia longa com a presença de uma insaturação, como o ácido oleico (C18:1), que constitui cerca de 80,3% da composição do óleo de oliva, 12,6% a mais do que a apresentada para o óleo da polpa do fruto de Macaúba (67,6%) (O'BRIEN, 1998; PIMENTA, 2010; ZAKIPOUR e DAD, 2012). Contudo, é importante destacar que, tanto o óleo de oliva como o óleo da polpa da Macaúba apresenta uma variabilidade em seu perfil graxo em função das condições de cultivo dessas plantas, podendo apresentar percentuais similares de ácido graxo oleico.

Destaca-se que este perfil diferenciado de produção de lipases em resposta ao substrato presente no meio foi observado por outros autores. Colen (2006), em estudo avaliando o efeito do tipo de óleo vegetal sobre a produção de lipase pelo *Cladosporium*

gloesporioides, observaram que os óleos de oliva, de milho, de girassol e de canola estimularam a produção de lipase, e que os óleos de arroz e de soja resultaram nos menores valores de produção da enzima. Esses autores atribuíram a diferença de produção entre os dois grupos à composição em ácidos graxos insaturados do primeiro grupo. No estudo de Bresciani (2011) voltado para avaliação da produção de lipase frente aos óleos vegetais babaçu, canola, milho, algodão, linhaça, oliva, arroz e soja, obtiveram os melhores resultados a partir do cultivo com óleo de oliva, sendo observada uma atividade de 50 UL⁻¹.

Neste trabalho, conforme apresentado na Figura 16, foi observado que as atividades variaram tanto com o fungo quanto com o tempo de cultivo. Para os fungos *Cladosporium cladosporonoides* M19 e *Fusarium proliferatum* M62, as atividades máximas foram observadas em 96h de fermentação, com valores de 0,07UmL⁻¹ e 1,26 UmL⁻¹, respectivamente. Para o fungo *Penicillium* sp. M89, a atividade máxima foi obtida no tempo de 48h, atingindo 0,79 UmL⁻¹. Para os isolados *Fusarium* sp. M184 e *Fusarium* sp. M233, as atividades máximas foram observadas no tempo de 168h de cultivo, de 2,18 UmL⁻¹ e 0,90 UmL⁻¹ respectivamente.

Estirpes do gênero *Cladosporium* (*Cladosporium cladosporonoides* M19) e *Penicillium* (*Penicillium* sp. M89), positivas neste ensaio para o óleo de Macaúba 1% e negativas para o óleo de oliva 1%, foram estudadas quanto a produção de lipase em outros substratos, sendo que os resultados deste trabalho concordam com valores reportados na literatura. Patil e outros (2015), dentre as cepas fúngicas avaliadas, a maior produtividade de lipase por *Cladosporium* sp. (0,72 UmL⁻¹). Enquanto Chinaglia e colaboradores (2014) encontraram valores de atividade lipásica para *Cladosporium cladosporioides* de 0,038 UmL⁻¹ em azeite de oliva e de 0,071 UmL⁻¹ em Tween 80 e, para *Penicillium solitum*, 0,11 UmL⁻¹ em azeite e 0,044 UmL⁻¹ em Tween 80. Lima e colaboradores (2013), obtiveram lipase com atividade de 0,6 UmL⁻¹ para *Penicillium* sp.

Não existem trabalhos na literatura utilizando apenas o óleo da polpa da Macaúba como substratos para produção de lipase, porém Filó e colaboradores (2013) avaliaram o aumento da produção de lipases extracelulares pela adição de óleos vegetais em FES pelo fungo *Trichoderma pseudokoningii*, entre os óleos utilizados, o óleo da amêndoa e da polpa da Macaúba, sendo que o óleo de amêndoa da Macaúba aumentou a produção de lipase em

cerca de $29,0 \pm 7,7\%$, enquanto que a adição de óleo da polpa de Macaúba ocasionou a diminuição da produção de lipase em relação ao controle.

5.1.3 Atividade Celulásica pelo Ensaio Quantitativo

Os isolados *Cladosporium cladosporonoides* M19, *Fusarium proliferatum* M62, *Penicillium* sp. M89, *Fusarium* sp. M184 e *Fusarium* sp. M233, que apresentaram atividade positiva para lipase nos ensaios quantitativos usando óleo de polpa da Macaúba como substrato foram avaliados quanto a produção de celulases. Conforme apresentado na Figura 17, todos os isolados apresentaram atividade celulásica após crescimento em meio de cultura líquido adicionado de carboximetilcelulose, sendo que as maiores atividades foram observadas para os isolados *C. cladosporonoides* M19 e *Penicillium* sp. M89, com valores de $0,017 \text{ UmL}^{-1}$, no tempo de 24h e $0,018 \text{ UmL}^{-1}$ no tempo de 72h respectivamente, embora as diferenças de atividade entre os isolados não tenha sido significativas ($p < 0,05$). Resultado oposto foi encontrado por Mushimiyimana e Tallapragada (2013), que evidenciaram que a produção de celulase aumentou com o aumento do tempo de cultivo.

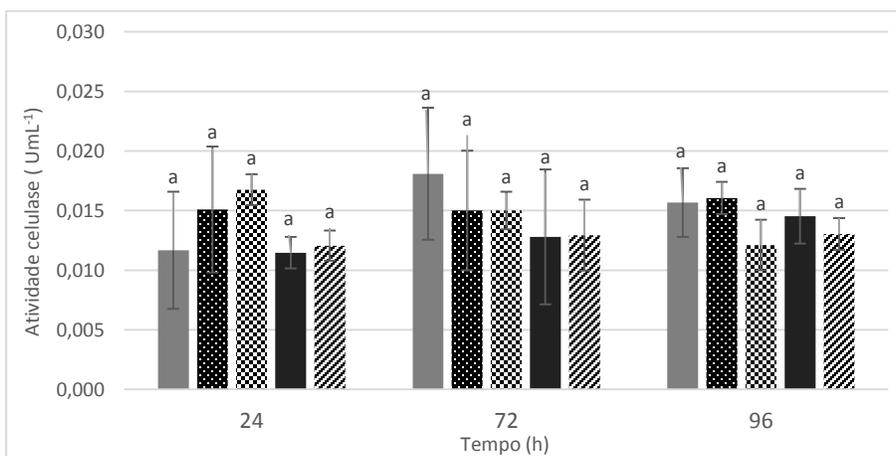


Figura 17- Atividade celulase de acordo com o tempo de cultivo em meio mineral suplementado com carboximetilcelulose 1%. *Letras iguais em um mesmo tempo significam que não houve diferença estatística entre as médias. Letras diferentes significam que ocorreu

diferença significativa ao nível de 5%. Legenda: ■ *C. cladosporonoides* M19; ■ *F. proliferatum* M62; ■ *Penicillium* sp. M89; ■ *Fusarium* sp. M184; ■ *Fusarium* sp. M233.

O potencial de produção de celulase por fungos dos gêneros estudados utilizando carboximetilcelulase como substrato foi relatado na literatura, sendo que alguns resultados são superiores aos encontrados neste estudo. Ramanathan e colaboradores (2010) relataram que a produção de celulase por *Fusarium oxysporum*, em 12 dias de cultivo com atividade de $0,654 \text{ UmL}^{-1}$. Enquanto Almeida (2013) avaliou a produção de celulases pelo fungo endofítico *Fusarium verticillioides*, sendo o valor ótimo encontrado foi menor, cerca de $0,1 \text{ UmL}^{-1}$.

Os fungos dos gêneros *Cladosporium* e *Penicillium* também já foram investigados para a produção de celulase usando diferentes substratos nas fermentações (JORGENSEN, *et al.*, 2005; ORGENSEN e OLSSON, 2006). Patil e colaboradores (2015), obtiveram atividade celulásica de $0,25 \text{ UmL}^{-1}$ para *Cladosporium* sp. Ritter e colaboradores (2013), estudando a utilização de sorbitol em associação com celulose para a produção de celulases por *P. echinulatum* 9A02S1, obtiveram atividade de $1,95 \text{ UmL}^{-1}$. Atividade máxima celulásica de $0,35 \text{ UmL}^{-1}$ foi obtida por *P. funiculosum* quando cultivado bagaço de cana de açúcar em estudo de Orgensen e Olsson, (2006).

Resultados semelhantes ao presente estudo também foram obtidos por Faheina (2012), que para o isolamento de diferentes linhagens obteve os seguintes resultados: *Fusarium* sp. SAP 09 com valores de $0,006 \text{ UmL}^{-1}$; *Lasiodiplodia theobromae* CNPAT040 de $0,029 \text{ UmL}^{-1}$; *Trichoderma* sp. LCB79 de $0,038 \text{ UmL}^{-1}$; *Trichoderma* sp. INPA666 de $0,028 \text{ UmL}^{-1}$; *Trichoderma* sp. INPA1014 de $0,009 \text{ UmL}^{-1}$ e; *Trichoderma* sp. INPA1218 de $0,016 \text{ UmL}^{-1}$.

5.1.4 Atividade Proteolítica pelo Ensaio Quantitativo

Os isolados *C. cladosporonoides* M19, *Fusarium proliferatum* M62, *Penicillium* sp. M89, *Fusarium* sp. M184 e *Fusarium* sp. M233, que apresentaram atividade positiva para lipase e celulase nos ensaios quantitativos, também foram avaliados para a produção de proteases. Conforme apresentado na Figura 18, a produção de protease foi positiva para todos

os isolados. Em geral, as atividades enzimáticas variaram com o isolado em estudo e com a idade da cultura. As maiores atividades foram observadas para o isolado *Penicillium* sp. M89 no período de 72-168 horas, com atividade máxima de 21,3 UmL⁻¹ após 96 horas de cultivo. A menor atividade proteolítica foi observada para o isolado *C. cladosporonoides* M19 no período de 72-168h, com atividade mínima de 0,6 UmL⁻¹ em 168h de cultivo.

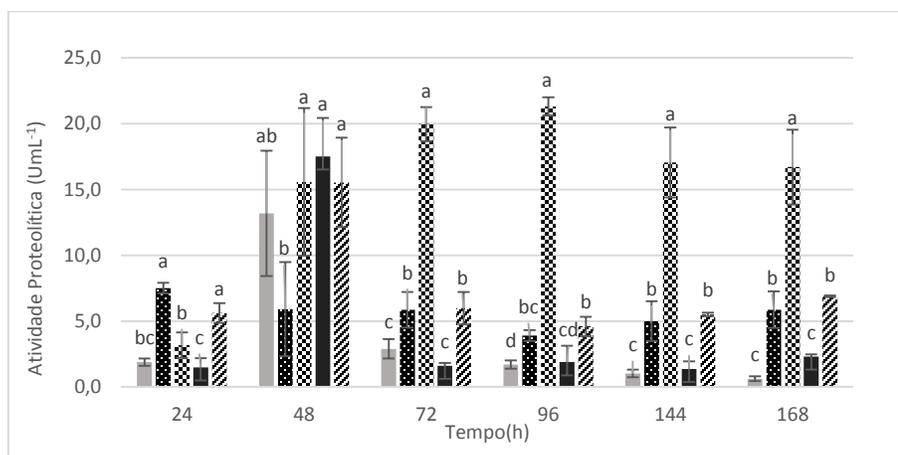


Figura 18- Atividade proteolítica de acordo com o tempo de cultivo em meio YCB suplementado com caseína 0,01% como fonte de carbono. *Letras iguais em um mesmo tempo significam que não houve diferença estatística entre as médias. Letras diferentes significam que ocorreu diferença significativa ao nível de 5%. Legend: ■ *C. cladosporonoides* M19; ▣ *F. proliferatum* M62; ▤ *Penicillium* sp. M89; ▥ *Fusarium* sp. M184; ▦ *Fusarium* sp. M233.

A literatura apresenta resultados positivos de produção de proteases para espécies de *Fusarium*, incluindo isolados provenientes de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) (BUENO *et al.*, 2009); batateira (*Solanum tuberosum*) (OLIVEIRA *et al.*, 2004); couve-flor (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) (SINGH e SAXENA, 1988). Os últimos autores associaram a importância das proteases e de outras enzimas às doenças causadas pelo fungo na cultura. A produção de protease, também foi encontrada por fungos para espécies do gênero *Cladosporium*, tais como *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium* sp. (PATIL, *et al.*, 2015; SILVA e LINS, 2008; EL-DIASTY e SALEM, 2007). Para o gênero *Penicillium*, estudos relataram a produção de protease por *Penicillium* sp e *P.*

aurantiigriseum (AGRAWAL *et al.*, 2004; GERMANO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2004).

As atividades proteolíticas obtidas pelos isolados deste estudo apresentam concordância com resultados da literatura. Bueno *et al.* (2009) obtiveram proteases por *Fusarium solani* com atividade 0,4 e 1,0UmL⁻¹. Patil e colaboradores (2015), obtiveram atividade proteolítica de 9,5UmL⁻¹ para *C. cladosporioides*; 11,0UmL⁻¹ para *Biosporus* sp.; 8,5UmL⁻¹ para *Aspergillus* sp.; 1,2UmL⁻¹ *Cladosporium* sp.; 1,17UmL⁻¹ *Curvularia* sp.; 0,5UmL⁻¹ *Colletotrichum* sp.; 8,6UmL⁻¹ *Rhizoctonia* sp.; 1,65UmL⁻¹ *Chaetomium* sp. e; 1,0 UmL⁻¹ para *Fusarium* sp. Atividade de protease alcalina de *Penicillium* sp. em fermentação (FES) de soja apresentou valor máximo em torno de 5.000 Ug⁻¹ de soja (AGRAWAL *et al.*, 2004). Lima *et al.* (2011), estudaram a produção de proteases por *P. aurantiigriseum*, sendo a atividade de 164 UmL⁻¹.

Adicionalmente, os isolados *F. proliferatum* M62, *Fusarium* sp. M184 e *Fusarium* sp. M233, caracterizados como produtores de protease neste ensaio, apresentaram resultado negativo no ensaio qualitativo em meio de cultura sólido. Este resultado indica que estes isolados podem produzir proteases em meio de cultura líquido com maior habilidade de difusão, conforme discutido anteriormente no item 5.2.2.

Um aspecto a ser considerado sobre proteases, é que as mesmas são responsáveis por catalisar a reação de hidrólise de ligações peptídicas de proteínas (KOBBLITZ, 2010). Assim, a produção de proteases em fermentações por um determinado microrganismo pode afetar a produção de outras enzimas, como as celulasas e lipases, por exemplo. Uma vez que, as proteases podem causar a modificação e a degradação destas proteínas, interferindo nas taxas de produção de enzima do processo fermentativo. Portanto, é recomendável o estudo de produção de proteases durante o cultivo com a verificação da possível associação entre a produção das mesmas e a diminuição de produção das enzimas de interesse (AHAMED *et al.*, 2005). Caso o fenômeno descrito seja observado, o pesquisador pode otimizar as condições de cultivo, visando estabelecer condições que inibam a produção de proteases e estimulem a produção das enzimas de interesse, bem como fazer uso de inibidores de proteases.

Nesse sentido, O'Donnel e colaboradores (2001) obtiveram melhoria da produção de proteínas heterólogas por *A. niger* recombinante por meio do controle de pH do meio, com

este foi observado a formação de proteases somente após o esgotamento da fonte de carbono, onde estudos demonstraram aumento das atividades proteolíticas com o início da autólise das células, devido ao esgotamento da fonte de crescimento (BRAGA, DESTEFANO e MESSIAS, 1999). Illanes e colaboradores (1988) aumentaram a estabilidade de celulasas (exoglucanase) produzidas por *T. reesei* no meio, pela adição do inibidor fenilmetilsulfunil fluoreto ao caldo na fase estacionária de cultivo, promovendo a inativação das proteases, conferindo completa proteção das enzimas e evitando a perda de atividade enzimática. Anthony e colaboradores (2003) por sua vez, observaram a inibição de proteases durante a fermentação para a produção de xilanases por uma linhagem de *A. fumigatus* pela adição de CuSO_4 ao cultivo, a qual não afetou a produção de xilanases.

5.2 Ensaio de Fermentação

5.2.1 Caracterização Química das Tortas

Os valores médios dos teores de umidade, óleo (lipídios), proteínas, lipídeos, carboidratos, hemicelulose celulase e lignina estão apresentados na Tabela 10 e discutidos nos itens subsequentes. Os valores elevados obtidos de lipídios e celulose permitiram conjecturar que as tortas analisadas apresentam potencial como insumos para produção de lipases e celulase.

Tabela 10: Composição química da torta de Macaúba

Composição química da torta de Macaúba	
Parâmetros %	Média \pm D.P
Umidade	4,8 \pm 0,22
Teor de óleo (lipídios)	20,3 \pm 1,10
Acidez	4,4 \pm 0,28
Proteína totais	7,09 \pm 0,11
Carboidratos totais	62,5 \pm 1,55
Hemicelulose	27,9 \pm 1,06

Celulose	28,7±1,52
Lignina	5,9±0,91

O valor de umidade encontrado, $4,8 \pm 0,22\%$ foi menor que os valores relatados na literatura, Veridiano (2012) relatou valores próximos a 8%, 14,2 % foi relatado por Santos filho, (2009) e valores na faixa entre 10 a 12% foram obtidos por Rezende e colaboradores, 2010. O tempo e temperatura de secagem da polpa para a extração do óleo e o método de extração do óleo podem ter contribuído para o menor teor de umidade encontrado neste trabalho.

Quanto ao teor de óleo (lipídeos), o valor de cerca de 20% deste trabalho é próximo aos descritos nos trabalhos de Veridiano (2012), Santos (2011), Rezende *et al.* (2010) e Rettore e Martins (1983). Santos (2011), encontrou para a torta da polpa da Macaúba o percentual de lipídeos de 22,6%. Valor inferior foi obtido por Pimenta (2010), que obteve uma torta com 5,47% de lipídios, indicando uma maior eficiência de extração do óleo durante a prensagem.

A torta apresentou o teor de acidez $4,8 \pm 0,22\%$, valor maior que o descrito por Veridiano (2012) de $2,7 \pm 0,2\%$. As variações encontradas em relação a acidez da torta de Macaúba estão relacionadas a todas as etapas do processamento, iniciando com o uso de procedimentos adequados ou não do tratamento pós colheita dos frutos, passando pelas etapas de separação e armazenamento das partes, preparo para a prensagem, prensagem, finalizando com o armazenamento da torta após extração do óleo. Esta influência é corroborada com o descrito por Tilahun *et al.* (2013), onde processo de acidificação pode ser causado pelos microrganismos que crescem associados aos frutos, pela alta umidade e atividade endógena de lipase no mesocarpo. Soma-se a estes fatores, o sistema de colheita extrativista, pelo qual o fruto é colhido no solo potencializando a contaminação por fungos. Além de enzimas hidrolíticas, os frutos podem conter peroxidases que catalisam reações de oxidação do óleo aumentando a acidez do mesmo. Assim, a época de colheita, os tratamentos pós-colheita e a condução do armazenamento podem interferir na atividade destas enzimas envolvidas nos processos de acidificação do óleo.

Da análise de proteína bruta na torta residual, quantificou-se um teor médio de 7,09 $\pm 0,11\%$. Este resultado é semelhante ao encontrado por Veridiano (2013), que encontrou o

valor de $8,0 \pm 0,5\%$. Mas valores inferiores a estes foram relatados por Galvani e Santos (2010) em torta mista formada pela polpa e amêndoa de Macaúba coletada na região de Corumbá, MS, (teor de 3,94%) e por Silva e colaboradores (2008) em torta da polpa da Macaúba colhida na cidade de Goiânia, sendo o teor de 4,14%.

Os valores de celulose ($27,9 \pm 1,06\%$), hemicelulose ($28,7 \pm 1,52\%$) e lignina ($5,9 \pm 0,91\%$), foram superiores aos encontrados por Santos (2011), de $11,49 \pm 1,08\%$ de celulose, $9,60 \pm 0,79\%$ de hemicelulose e $4,33 \pm 0,12\%$ de lignina. Resultados diferentes de composição de proteínas, celulose, hemicelulose e lignina podem estar relacionados a variabilidade genética dos frutos de diferentes regiões, a diferentes características de solo e manejo de adubações, ou ainda, ao estágio de maturação dos frutos (REOLON, 2009).

Em relação aos valores de carboidratos totais, $62,5 \pm 1,55\%$, os dados obtidos foram semelhantes aos de Veridiano (2013) que encontrou valores de $53,36\% \pm 0,5$ de carboidratos. Ferrari e Ocanha (2011) encontraram o teor de 60,1% de carboidratos para a torta da polpa de Macaúba colhida na região leste de São Paulo. Essas variações mostram as diferenças entre as regiões de colheita dos frutos.

5.2.2 Ensaios Preliminares de Otimização da Produção de Lipases e Celulases por Isolados Fúngicos em Fermentação Submersa Usando como Fonte de Carbono a Torta de Macaúba

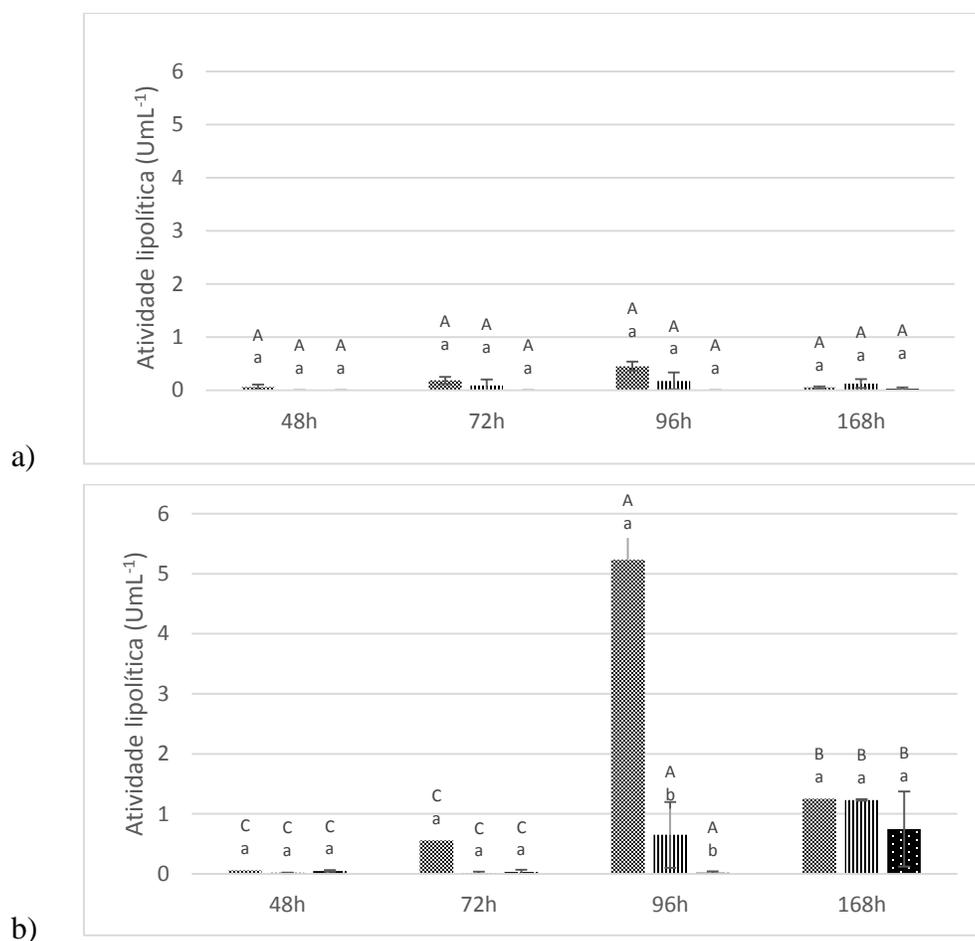
5.2.2.1 Influência da Concentração do Óleo da Macaúba na Produção de Lipase

A natureza e a concentração da fonte de carbono influenciam para a produção de lipase. Para avaliar tal influência, os isolados *C. cladosporonoides* M19, *Fusarium proliferatum* M62, *Penicillium* sp. M89, *Fusarium* sp. M184 e *Fusarium* sp. M233 foram cultivados em meios adicionados de diferentes concentrações de óleo de Macaúba e tempos de cultivo.

Conforme mostrado na Figura 19, de modo geral, a produção de lipases foi afetada pela concentração do óleo de Macaúba, pelo tempo de cultivo e pelo isolado de fungo ($p < 0,05$). O isolado que apresentou a melhor atividade lipolítica foi *F. proliferatum* M62 ($p < 0,05$), sendo que, dentre os tempos e concentrações avaliadas, concentrações iguais a

0,75% e o tempo de 96h de cultivo, levaram aos maiores valores de atividade enzimática para todos isolados com diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$).

Em relação à influência dos fatores para cada isolado ($p < 0,05$), observou-se que para *C. cladosporonoides* M19, o tempo e a concentração do óleo no meio de cultura não afetaram a atividade da enzima. Para *F. proliferatum* M62 e *Fusarium* sp. M233, a concentração de 0,75% e o tempo de 96h proporcionaram os maiores valores de atividade. Enquanto para, *Penicillium* sp. M89, apenas o tempo afetou a atividade lipolítica, sendo que o tempo de 48h levou a maiores valores de atividade. O isolado *Fusarium* sp. M184 apresentou os maiores valores quando cultivado no período de 96h-168h, e na concentração de 0,75% (Figura 19).



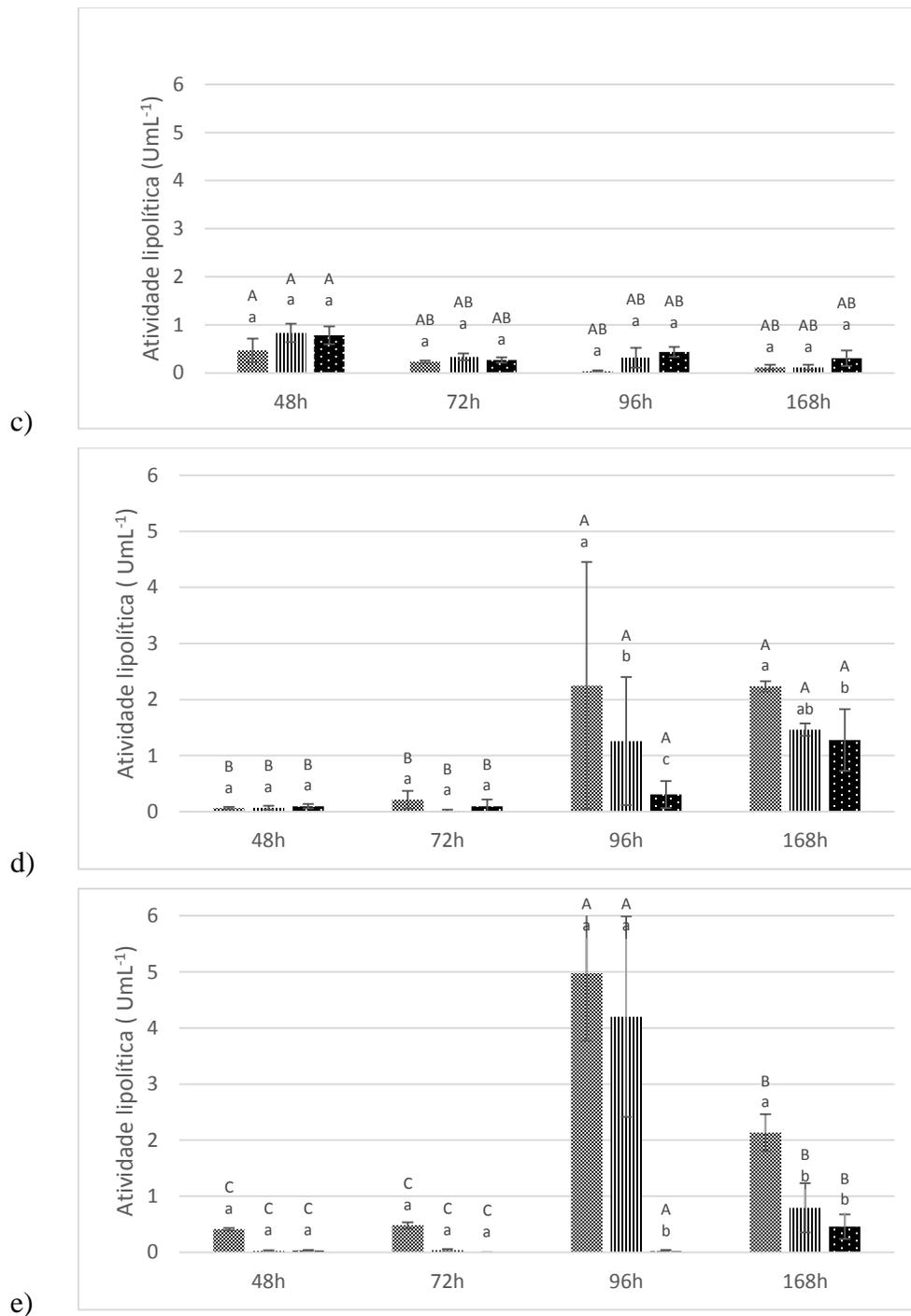


Figura 19- Efeito da concentração do óleo de Macaúba na produção de lipase de acordo com o tempo pelos isolados *C. cladosporonoides* M19 (a), *F. proliferatum* M62 (b), *Penicillium* sp. M89 (c), *Fusarium* sp. M184 (d) e *Fusarium* sp. M233 (e). * Letras maiúsculas comparam médias do tempo de cultivo dentro de um mesmo isolado; letras minúsculas comparam

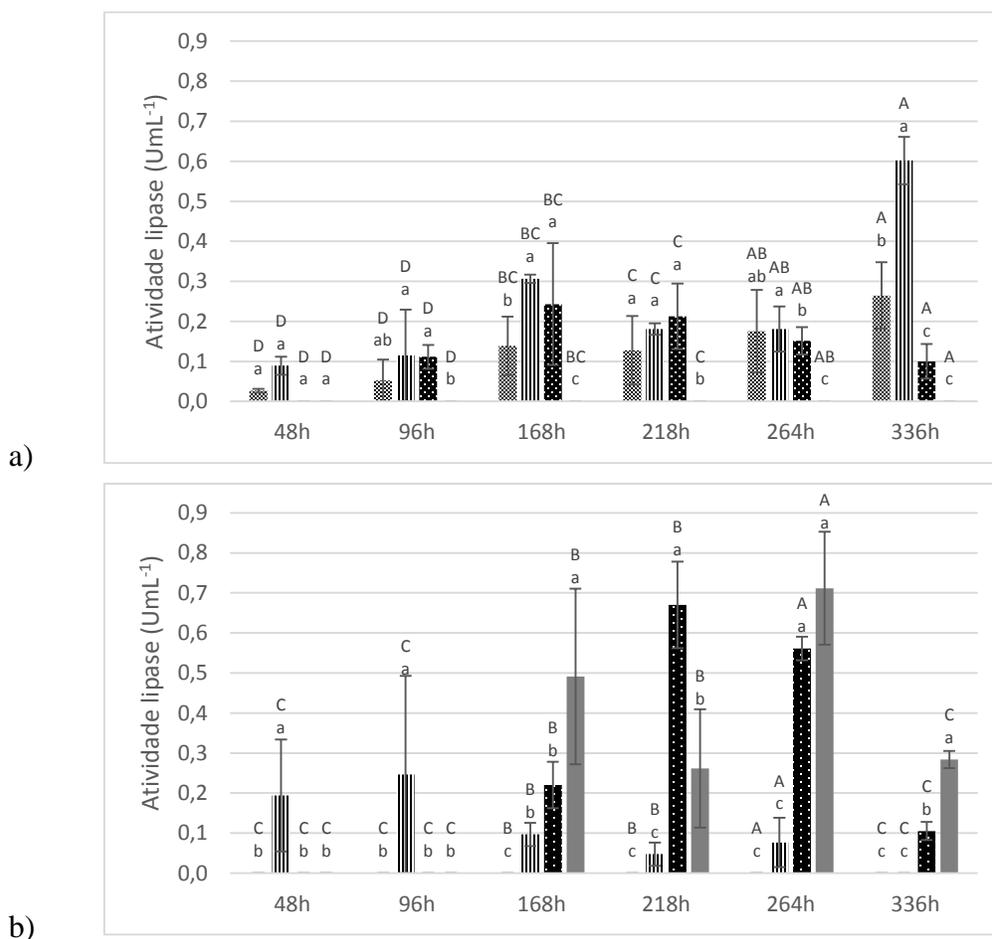
médias da concentração do óleo dentro de cada tempo de cultivo de cada isolado. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, $p < 0,05$). Legenda: ■ 0,75%; ▨ 1,5%; ▩ 3% de óleo de Macaúba.

A diminuição de atividade lipolítica com o aumento da concentração de óleo adicionado no meio de cultura pode ser resultado da repressão da produção da enzima em função do incremento da concentração do ácido oleico durante o cultivo uma vez que a transferência de oxigênio no meio de cultura é reduzida devido a baixa solubilidade do ácido oleico em concentrações elevadas, baixas concentrações de oxigênio podem alterar o metabolismo do fungo e, conseqüentemente, na produção de lipase (GRBAVCIC, 2007). Em estudo conduzido por Li e colaboradores (2006) foi observado que concentrações de até 0,4% m/m de ácido oleico induziram a produção de lipase, enquanto concentrações maiores resultaram na diminuição da atividade lipolítica.

Diversos estudos têm mostrado que as concentrações de óleo necessárias para a máxima produção de lipases podem variar com o microrganismo em estudo e com as condições de cultivo. Não foram encontrados resultados na literatura sobre o efeito da concentração do óleo de Macaúba. Para o isolado *P. aurantiogriseum*, 0,5% foi a concentração de azeite de oliva que resultou na máxima produção de lipase e concentrações superiores a 1% reduziram a produção da enzima (LIMA et al., 2003). Enquanto Turati (2012) observaram que para *P. janthinellum*, a melhor produção foi obtida com a adição de 0,5% m/v de óleo de oliva. Hosseinpour e colaboradores (2011), ao investigarem o efeito de altas concentrações de óleo de oliva na produção de lipase por *Aspergillus niger* NCTM 584 indicaram a concentração de 12g/L de óleo, como a melhor para a produção da enzima. Para a espécie *A. Japonicus* a melhor produção foi obtida com 1% deste substrato (SOBHA, et al., 2014). Dutra (2007), obteve para *A. niger* 11T53A14 maiores valores de atividade com 2% m/m usando óleo de mamona como fonte de carbono suplementar, sendo concentrações superiores causaram queda significativa na atividade lipolítica. Para *Bacillus* sp., a concentração ótima de óleo de oliva para a produção de lipase foi de 1% (SHAH et al., 2007).

5.2.2.2 Influência da Concentração da Torta da Macaúba na Produção de Lipase

Os resultados referentes à produção de lipase por tempo em diferentes concentrações da torta da Macaúba podem ser visualizados na Figura 20. As concentrações 1,75%, 3,75%, 7,5% e 15% equivalem a 0,35%, 0,75%, 1,5% e 3%, respectivamente de óleo de Macaúba na torta. As maiores produções de lipase para os isolados diferiram quanto à concentração de torta e ao tempo de cultivo ($p < 0,05$).



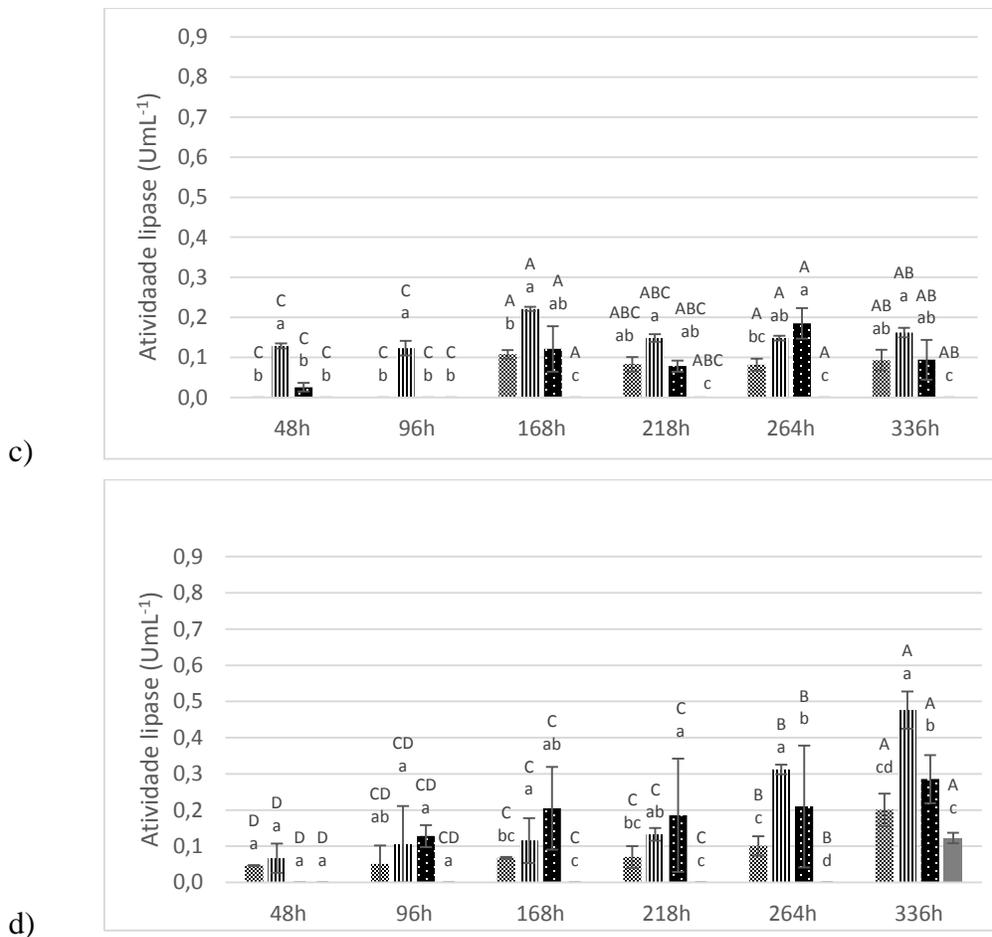


Figura 20- Efeito da concentração da torta de Macaúba na produção de lipase de acordo com o tempo, pelos isolados *F. proliferatum* M62 (a), *Penicillium* sp. M89 (b), *Fusarium* sp. M184 (c) e *Fusarium* sp. M233 (d). * Letras maiúsculas comparam médias do tempo de cultivo dentro de um mesmo isolado; letras minúsculas comparam médias da concentração da torta dentro de cada tempo de cultivo de cada isolado. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente (Tukey, $p < 0,05$). Legenda: ■ 1,75%; ▨ 3,75%; ▩ 7,5%; ■ 15% de torta de Macaúba.

Não foi observada atividade lipolítica nos extratos provenientes do cultivo do isolado *C. cladosporonoides* M19 no meio com torta de Macaúba. Esse resultado indica que a enzima não foi produzida ou a atividade da mesma foi inibida por componentes da torta de Macaúba. Este resultado pode estar relacionado com a regulação da expressão dos genes relacionados à síntese das diversas enzimas hidrolíticas dos fungos. Tem sido sugerido que na presença de

resíduos complexos, como a torta de Macaúba, o metabolismo do fungo é direcionado de acordo com as concentrações destes substratos ou fatores físicos ou bioquímicos, tais como a presença de enzimas, alosterismo, isoenzimas, entre outros. Este fato pode explicar o direcionamento do metabolismo do fungo para o uso de alguns substratos como fonte de carbono em detrimento de outros (NELSON e COX, 2011).

Adicionalmente, os resultados encontrados para a produção de lipase na torta de Macaúba para todos os isolados foram inferiores aos encontrados nas fermentações utilizando apenas o óleo de Macaúba como substrato, o que contribui para a discussão sobre a influência da regulação gênica na produção de enzimas. Contudo deve-se destacar que em geral para os isolados *F. proliferatum* M62 (a), *Fusarium* sp. M184 (c) e *Fusarium* sp. M233 (d), a maior atividade foi obtida para a concentração de torta de 3,75%, equivalente a concentração de óleo de 0,75%, situação na qual foram obtidos os maiores valores de atividade no ensaios com o uso de óleo.

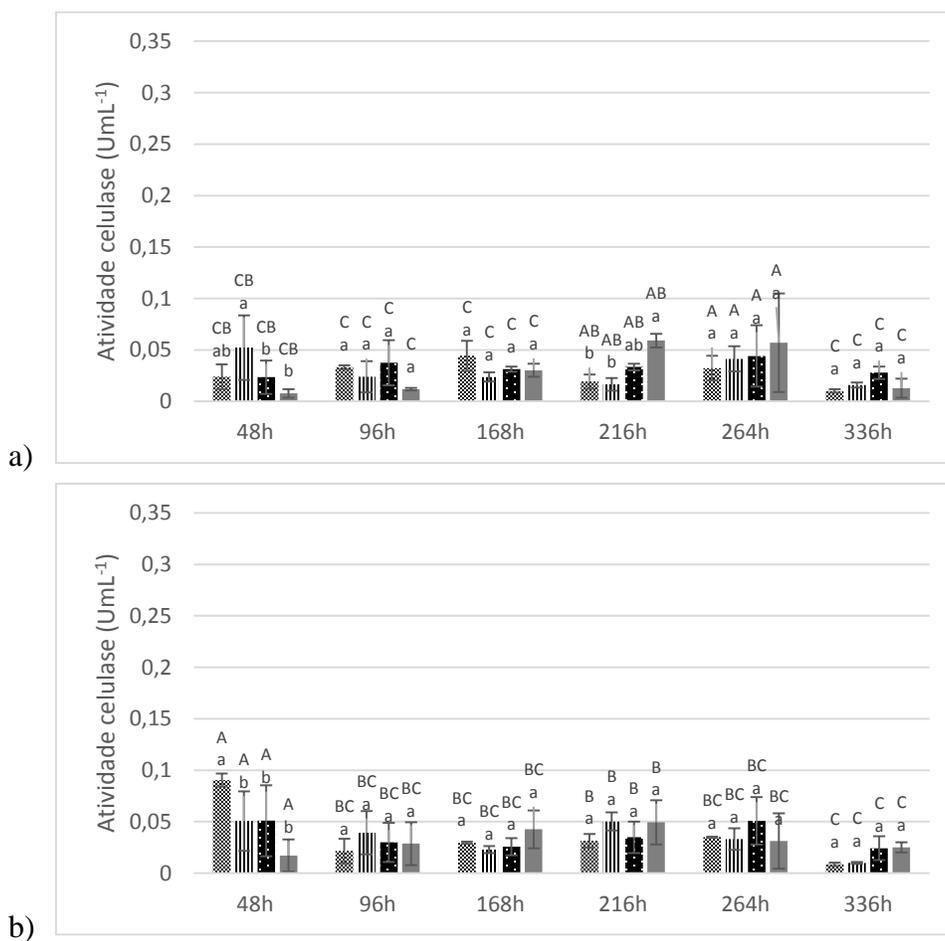
Os isolados *F. proliferatum* M62, *Fusarium* sp. M184 e *Fusarium* sp. M233 não produziram lipases na concentração do substrato de 15% (3% de óleo correspondente) no tempo de cultivo estudado. Este resultado pode estar relacionado à inibição de produção da enzima em função da elevada concentração do ácido oleico no cultivo (conforme discutido no item 5.3.2.1), onde a maior concentração do óleo também inibiu a produção de lipases para esses isolados.

Em relação a cada isolado, para o isolado *Fusarium* sp. M233, o tempo com maiores valores de atividade lipolítica foi de 336h e concentração de 3,75% e 7,5% de torta ($p < 0,05$). Para o isolado *Penicillium* sp. M89, o período de 218 e 264h com respectivas concentrações de 7,5% e 15% proporcionaram maiores valores de atividade da enzima ($p < 0,05$). Para o isolado *Fusarium* sp. M184, os maiores valores de atividade lipolítica foram obtidos na concentração de 3,75% e no período de cultivo de 168 e 336h ($p < 0,05$). O isolado *F. proliferatum* M62 apresentou maiores resultados quando cultivado na concentração de 3,75% de torta e no período de 264 e 336h de cultivo ($p < 0,05$).

Da análise geral, destaca-se que a maior atividade lipolítica foi obtida pelo isolado *Penicillium* sp. M89 ($p < 0,05$), no período de 264 e 336h e respectivas concentrações de 7,5% e 15% de torta ($p < 0,05$).

5.2.2.3 Influência da Concentração da Torta da Macaúba na Produção de Celulase

Os resultados da atividade da celulase produzida pelos cinco isolados testados estão apresentados na Figura 21. Cada isolado apresentou um perfil diferenciado de produção de enzimas em função do tempo frente à concentração da torta de Macaúba ($p < 0,05$), resultado esperado devido às características fisiológicas e bioquímicas únicas dos diferentes fungos analisados.



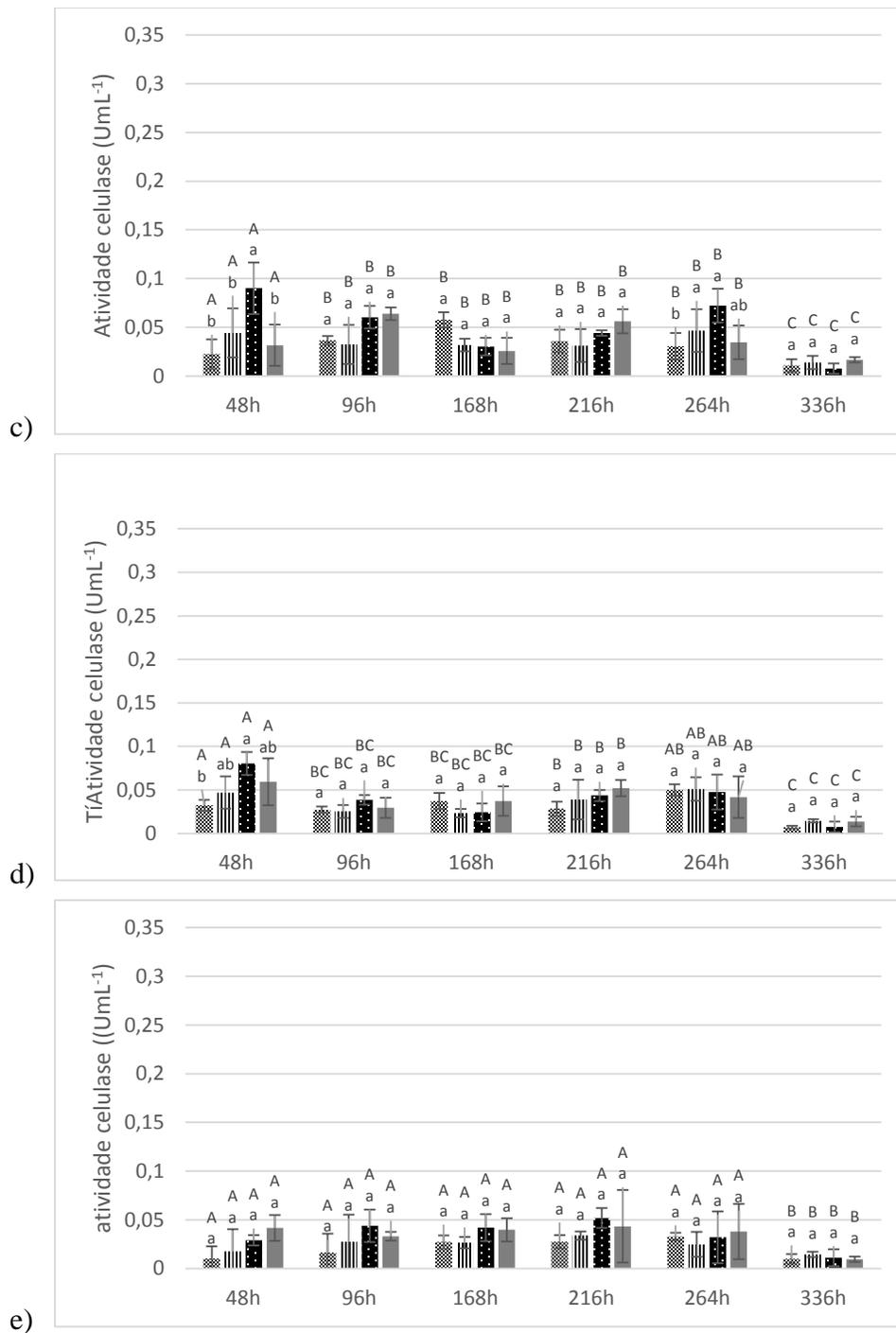


Figura 21- Efeito da concentração da torta de Macaúba na produção de celulase de acordo com o tempo, pelos isolados *C. cladosporonoides* M19 (a), *F. proliferatum* M62 (b), *Penicillium* sp. M89 (c), *Fusarium* sp. M184 (d) e *Fusarium* sp. M233 (e). * Letras maiúsculas comparam médias do tempo de cultivo dentro de um mesmo isolado; letras

minúsculas comparam médias da concentração da torta dentro de cada tempo de cultivo de cada isolado. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente (Tukey, $p < 0,05$). Legenda: ■ 1,75%; ▨ 3,75%; ▩ 7,5%; ■ 15% de torta de Macaúba.

Em geral, os isolados *Penicillium* sp. M89 e *F. proliferatum* M62 apresentaram os maiores valores de atividade celulásica, sendo os maiores valores observados no tempo de cultivo de 48h e 264h e na concentração de 7,5% e 15% da torta de Macaúba ($p < 0,05$).

Em relação a cada isolado, *C. cladosporonoides* M19 apresentou os maiores valores quando cultivado no período de 216-264h, o isolado *F. proliferatum* M62 no período de 48h e *Fusarium* sp. M184 nos tempos de 48h e 264h. Porém, para estes isolados não houve influência das concentrações analisadas na atividade celulásica ($p < 0,05$). *Penicillium* sp. M89 obteve as maiores atividades nos tempos de cultivo de 48h e na concentração de 7,5%, enquanto o isolado *Fusarium* sp. M233 no período de cultivo de 48h-264h e nas concentrações de 3,75% e 7,5% ($p < 0,05$).

A concentração de 7,5% de torta de Macaúba resultou nos melhores valores de atividade enzimática. Resultado aproximado foi apresentado na literatura quando *Trichoderma reesei* foi cultivado em celulose 6% em estudo de Sternberg e Dorval (1979) e cultivado em celulose 5% em estudo de Hendy e colaboradores (1984). Os resultados encontrados podem estar relacionados à concentração de nutrientes disponibilizados pela torta de Macaúba. Segundo Singhanian *et al.* (2010), parâmetros como tipo e concentração de fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, pH, umidade e temperatura representam variáveis operacionais determinantes no processo de fermentação. No caso de fermentações de coprodutos agroindustriais, como a torta de Macaúba, estes podem ser ricos em nutrientes que podem ser utilizados como fonte de carbono para o crescimento celular e para síntese enzimática, sendo que a resposta das células fúngicas aos diferentes nutrientes varia dependendo da concentração e tipo de substrato (GONG; TSAO, 1975).

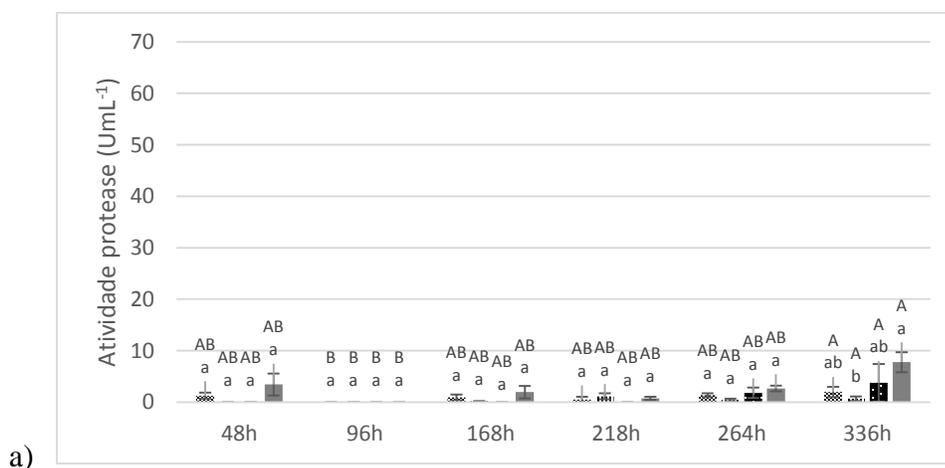
As atividades celulásicas obtidas da fermentação da torta de Macaúba no presente estudo foram superiores (valor máximo de $0,09 \text{ UmL}^{-1}$) às obtidas nas fermentações adicionadas de carboximetilcelulose (valor máximo de $0,02 \text{ UmL}^{-1}$) indicando a torta de macaúba como uma ótima fonte de carbono para a produção dessas enzimas. Efeito semelhante foi descrito para uma linhagem de *Aspergillus niger*, que apresentou maior

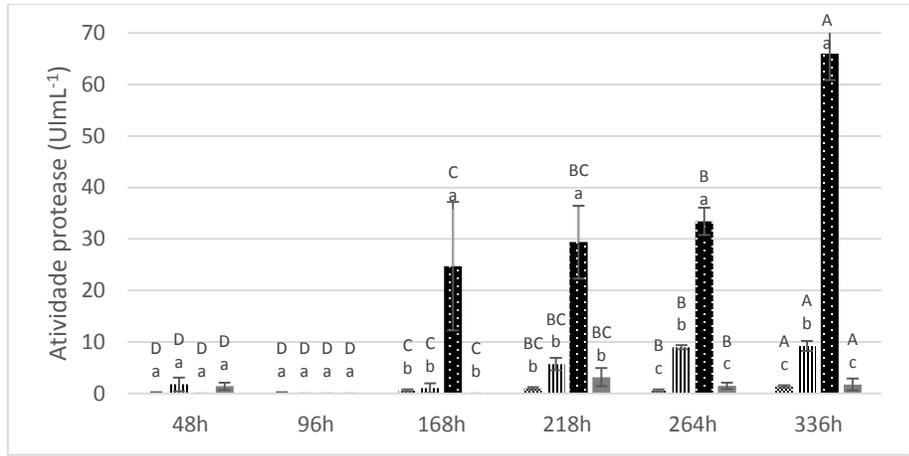
atividade celulásica em fermentações usando bagaço de cana-de-açúcar como substrato em comparação a carboximetilcelulose e papel de filtro (MENEZES *et al.*, 1976).

No tempo de 336h (14 dias), todos os isolados apresentaram queda na atividade celulásica, sendo que estudos têm demonstrado que diminuições da atividade enzimática podem estar relacionadas ao esgotamento dos nutrientes, morte celular, ação de proteases e, conseqüentemente, na diminuição da formação de enzimas (SHAFIQUE *et al.*, 2009).

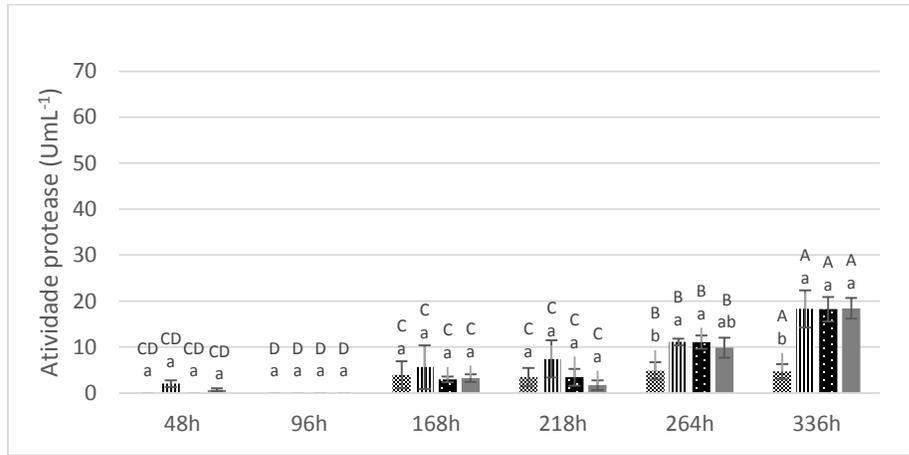
5.2.2.4 Influência da Concentração da Torta da Macaúba na Produção de Protease

Conforme apresentado na Figura 22, todos os isolados em estudo apresentaram atividade proteolítica durante o cultivo em meio adicionado de torta de Macaúba em diferentes concentrações. De forma geral, foi observado aumento de atividade com o aumento da concentração da torta de Macaúba e com o tempo de cultivo ($p < 0,05$). Os isolados *F. proliferatum* M62, *Fusarium* sp. M184 e *Fusarium* sp. M233 apresentaram as maiores atividades proteolíticas, sendo que a concentração de 7,5% no tempo de 336h foram as condições que proporcionaram o aumento dos valores de atividade em relação a todos os isolados.

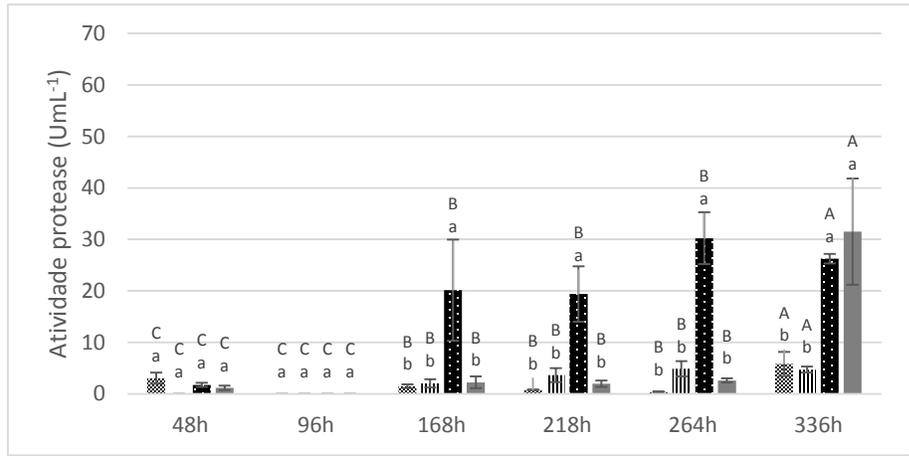




b)



c)



d)

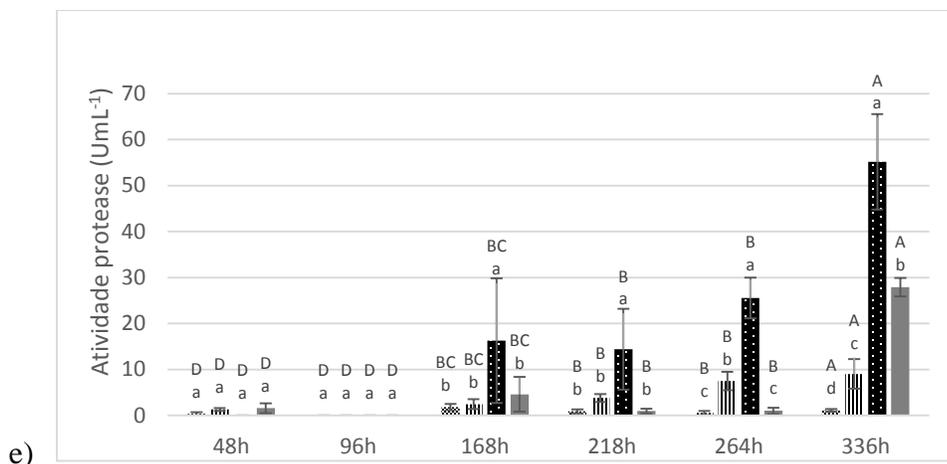


Figura 22- Efeito da concentração da torta de Macaúba na produção de protease de acordo com o tempo, pelos isolados *C. cladosporonoides* M19 (a), *F. proliferatum* M62 (b), *Penicillium* sp. M89 (c), *Fusarium* sp. M184 (d) e *Fusarium* sp. M233 (e). * Letras maiúsculas comparam médias do tempo de cultivo dentro de um mesmo isolado; letras minúsculas comparam médias da concentração da torta dentro de cada tempo de cultivo de cada isolado. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente (Tukey, $p < 0,05$). Legenda: ▨ 1,75%; ▩ 3,75%; ▧ 7,5%; ■ 15% de torta de Macaúba.

Analisando os comportamentos individuais, tem-se que isolado *Penicillium* sp. M89 os maiores valores foram obtidos no tempo de 336h e nas concentrações de 3,75%, 7,5% e 15% ($p < 0,05$), enquanto para *C. cladosporonoides* M19 em 15%, sendo que o tempo de cultivo não influenciou na produção da enzima.

Observa-se na Figura 22 que no tempo de 96h a atividade foi nula para todos os isolados. Estudos correlacionam esse declínio da atividade proteolítica nos tempos iniciais de cultivo à germinação de esporos, uma vez que este processo requer a participação de proteases, as quais podem perder a atividade proteolítica rapidamente após a germinação dos mesmos (TREMACOLDI, 2009). Por outro lado, o aumento da atividade proteolítica a partir de 168h de cultivo pode estar relacionado à regulação da expressão gênica de enzimas, devido ao esgotamento das fontes de carbono preferenciais presentes no meio de cultivo levando a lise celular. No estudo conduzido por Li e colaboradores (2008), que utilizaram uma linhagem de *A. niger* geneticamente modificada, atividades de proteases extracelulares foram observadas somente após o esgotamento da fonte de carbono em meio completo específico

para *Aspergillus*. Os estudos de Ahamed e Vermette (2008) correlacionam a atividade proteolítica aumentada à lise celular.

5.2.2.5 Relação da Atividade Proteolítica e Atividade Lipásica e Celulásica

Utilizando o modelo de Correlação de Pearson na Tabela 11 estão apresentados os resultados da análise de correlação entre as atividades da protease e das enzimas lipase e celulase, que foi realizada visando avaliar se a produção de proteases causou efeito negativo nas atividades das demais enzimas hidrolíticas.

Tabela 11: Coeficiente de Pearson da correlação entre a produção de protease e lipase em diferentes concentrações da torta de Macaúba de acordo com o tempo de cultivo.

Coeficiente de Pearson								
Isolados	Protease versus Lipase				Protease versus Celulase			
	Concentração da torta de Macaúba				Concentração da torta de Macaúba			
	1,75%	3,75%	7,5%	15%	1,75%	3,75%	7,5%	15%
M19	-	-	-	-	-0,38 (0,45)	-0,21 (0,69)	-0,06 (0,89)	-0,35 (0,49)
M62	0,90 (0,01)	0,54 (0,26)	0,28 (0,59)	-	-0,57 (0,23)	-0,40 (0,42)	-0,51 (0,29)	0,41 (0,41)
M89	-	-0,90 (0,01)	0,17 (0,74)	0,44 (0,38)	-0,15 (0,76)	-0,20 (0,69)	-0,44 (0,37)	-0,57 (0,24)
M184	0,18 (0,75)	0,28 (0,59)	0,93 (0,07)	-	-0,63 (0,18)	-0,15 (0,77)	-0,55 (0,25)	-0,69 (0,13)
M233	0,32 (0,54)	0,76 (0,07)	0,83 (0,03)	0,99 (0,00)	-0,16 (0,75)	-0,54 (0,26)	-0,84 (0,03)	-0,95 (0,00)

*Valores na parte superior são os coeficientes de correlação de Pearson e valores entre parênteses são p-valor ou significância ($p < 0,05$); Células vazias indicam que a atividade lipolítica foi nula, portanto não há como estabelecer correlação.

Quando as atividades enzimáticas foram comparadas entre a produção de protease e lipase nas diferentes concentrações, pelo coeficiente de Pearson, em geral as correlações foram positivas para a maioria dos isolados e concentrações de acordo com o nível de significância ($p < 0,05$). A exceção, ocorreu apenas para o isolado *Penicillium* sp. M89 e

concentração de 3,75%, que apresentou associação inversa (negativa) significativa entre a produção dessas enzimas ($p < 0,05$).

Em relação à produção de protease e celulase, verifica-se que em geral apesar de negativas, todas as correlações podem ser classificadas como fracas, de acordo com o nível de significância ($p < 0,05$). Correlações negativas com significância estatística foram apresentadas apenas para o isolado *Fusarium* sp. M233, nas condições de cultivo de 7,5% e 15% de torta, onde ocorreu uma associação inversa entre a produção de celulase e protease, indicando que a produção de protease pode estar interferindo na produção de celulases.

Da literatura tem-se que o efeito da produção de enzimas proteolíticas durante a fermentação para a produção de enzimas hidrolíticas pode ser neutro ou negativo, estudos relatam a produção de proteases em fermentação por *Bacillus* sp. SMIA-2, *Candida tropicalis*, *A. oryzae*, *A. niger*, em conjunto com outras enzimas sem efeito negativo, (CORRÊA, 2009; PARIS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2015). Enquanto outros estudos indicam que a produção de enzimas hidrolíticas pode ser afetada negativamente pela produção de proteases produzidas em fermentação por *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350 e *A. niger* (SILVA, 2012; CUNHA, 2011).

5.2.3 Otimização da Fermentação

5.2.3.1 Delineamento Fatorial Fracionado de Níveis Mistos L12 para Seleção de Variáveis Significativas sobre a Atividade das Lipases e Celulases pelo isolado *Penicillium* M89.

O isolado fungíco *Penicillium* sp. M89, foi selecionado para os experimentos de otimização, devido a alta produção de celulase e lipase e a não correlação inversa entre a produção destas enzimas e a produção de proteases.

Para a otimização, um delineamento fatorial fracionado de níveis mistos foi planejado como primeiro passo da otimização em meio sintético. Os fatores de variação deste trabalho foram pH, temperatura, concentração da torta de Macaúba, fonte de nitrogênio e concentração da fonte de nitrogênio, seguindo a mesma tendência de outros trabalhos de fermentação da torta de Macaúba e estudos de otimização de produção de celulase e lipase

por *Penicillium* sp. (VARGAS, *et al.*, 2008; SILVA, 2012; SANTOS, 2013; FEITOSA e FELBER, 2010; OLIVEIRA, *et al.*, 2014).

As medições de atividade enzimática foram feitas a cada 48 horas para avaliar a produção de enzimas em estudo de acordo com o tempo. Os resultados estão apresentados nas Figuras 23 e 24.

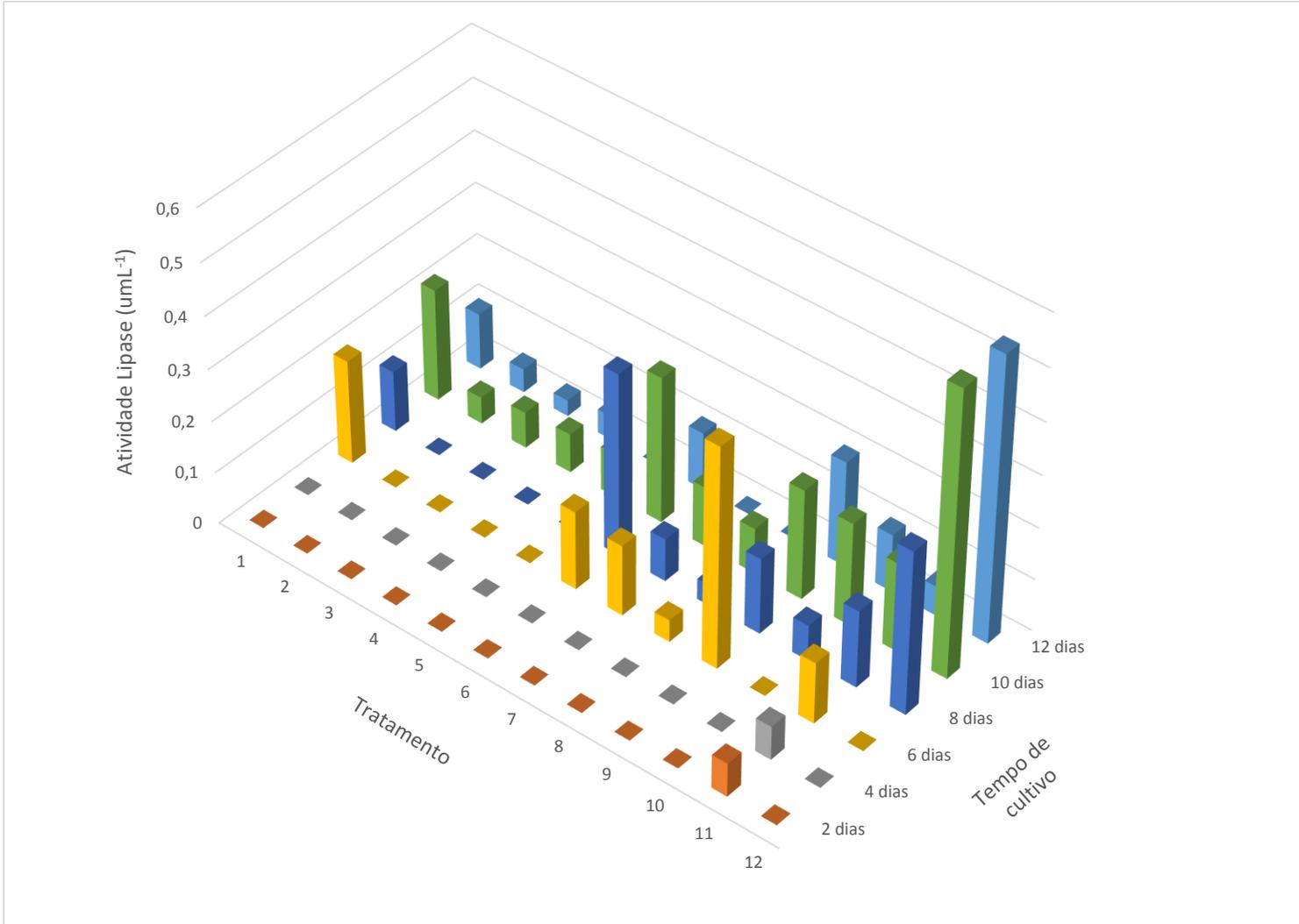


Figura 23- Variação da atividade da lipase microbiana em relação ao tratamento e tempo de cultivo.

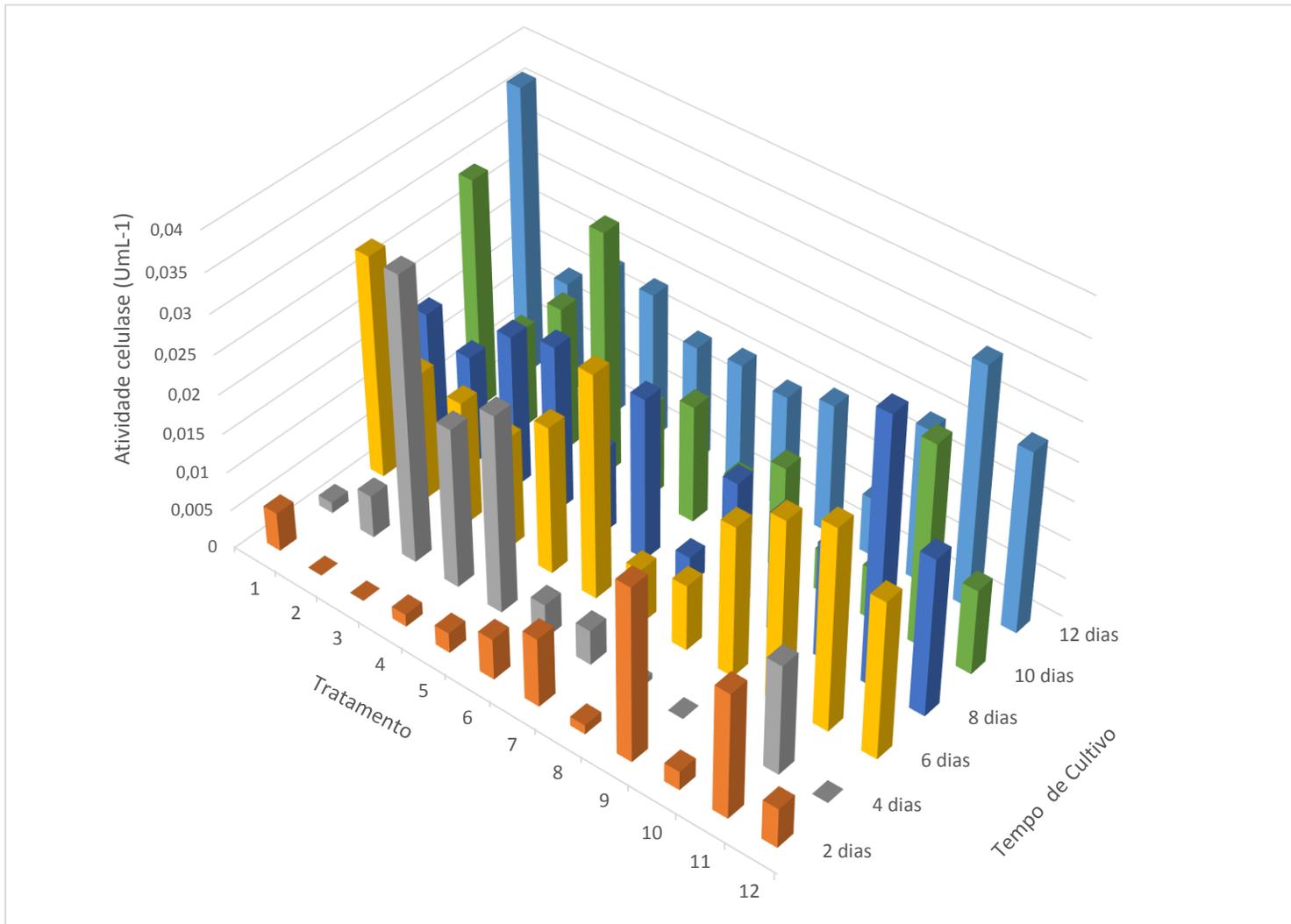


Figura 24- Variação da atividade da celulase microbiana em relação ao tratamento e o tempo de cultivo.

De modo geral, as maiores atividades foram obtidas no período de 10 a 12 dias de cultivo ($p < 0,05$). Assim, as análises para avaliar os efeitos das variações em estudo sobre a produção das enzimas foram realizadas com os dados de 12 dias de tempo de cultivo. O período de maior produção das enzimas variou com as combinações das variáveis e seus níveis.

A maior atividade da lipase em geral foi obtida no frasco 12, com $0,55 \text{ UmL}^{-1}$ com 12 dias de cultivo, tendo sido utilizado 10% de concentração de torta, extrato de levedura 2%, $\text{pH} = 5$ e temperatura de 25°C .

A maior atividade da celulase, esta foi obtida no frasco 1, com $0,04 \text{ UmL}^{-1}$ com 12 dias de cultivo, tendo sido utilizado 10% de concentração de torta, ureia 0,2%, $\text{pH} = 5$ e temperatura de 25°C .

A matriz do planejamento experimental com a combinação dos fatores e as respostas obtidas experimentalmente em cada uma dessas combinações podem ser visualizadas na Tabela 12. A partir da observação e teste sobre os dados experimentais de atividade enzimáticas dos diferentes tratamentos foi encontrado o modelo de melhor ajuste para cada enzima, admitindo-se um “valor de p” significativo quando esse fosse menor que 0,05. As análises dos efeitos dos fatores sobre as respostas permitiram a avaliação de quais delas influenciaram significativamente a produção de lipase e celulase, resultando na tomada de decisão com relação à escolha dos fatores a serem selecionados para o próximo passo da otimização.

Tabela 12: Fatores e respostas do delineamento fatorial fracionado misto relacionadas atividade de lipase e celulase por *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa, em 12 dias de cultivo.

Frasco	pH	T(°C)	% Fonte de C.	% da Fonte de N.	Fonte de N.	Lipase (UmL^{-1})	Celulase (UmL^{-1})
1	5	25	10	0,2	ureia	$0,11 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,0001$
2	8	35	10	0,2	ureia	$0,05 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,00005$
3	8	25	5	2	ureia	$0,03 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,00003$
4	5	35	5	2	ureia	$0,05 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,00005$
5	5	25	5	0,2	N. de amônio	0	$0,02 \pm 0,0000$
6	8	25	10	0,2	N. de amônio	$0,11 \pm 0,12$	$0,02 \pm 0,00011$

7	5	35	5	2	N. de amônio	0	0,01±0,0000
8	8	35	10	2	N. de amônio	0	0,02±0,0000
9	8	35	5	0,2	E. Levedura	0,20±0,06	0,01±0,00020
10	5	35	10	0,2	E. Levedura	0,11±0,04	0,02±0,00011
11	8	25	5	2	E. Levedura	0,06±0,01	0,03±0,00006
12	5	25	10	2	E. Levedura	0,55±0,16	0,02±0,0005

As interpretações dos efeitos dos fatores sobre as respostas produção de lipase e celulase são apresentadas nas Tabelas 13 e 14 e nos Anexos 4 e 5. Ainda, os gráficos das Figuras 25 e 26 permitem a visualização dos principais efeitos associado ao comportamento do fator sobre a resposta.

A variável resposta relacionada à atividade lipolítica foi influenciada de forma significativa pelos fatores concentração da torta de Macaúba e fonte de nitrogênio ($p < 0,05$) (Tabela 13). O tipo e concentração da fonte de carbono têm sido relatados como variáveis que influenciam fortemente na atividade de lipases por *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Candida cylindracea*, *Geotrichum candidum*, *P. citinum*, *Rhizopus arrhizus* e *R. oryzae* (ELLIAH et al., 2004; D'ANNIBALE et al., 2006; SHARMA et al., 2001). Em relação à fonte de nitrogênio, estudos indicam que diferentes fontes de nitrogênio possuem efeito variado na atividade lipolítica, entretanto fontes orgânicas como peptona e extrato de levedura foram relacionadas ao aumento da atividade dessa enzima (GUNASEKARAN, KOTAY e DAS, 2006).

Tabela 13: Análise de variância para a resposta, produção de lipase por fermentação submersa pelo isolado *Penicillium* sp. M89 segundo delineamento fatorial fracionado misto, em 12 dias de cultivo.

Termo	GL	SQ	QM	F	T	P
pH	1	0,03	0,03	2,63	-1,62	0,115
Temperatura	1	0,05	0,05	3,94	-1,99	0,057
% Fonte de Carbono	1	0,08	0,10	8,46	2,91	0,007
% da Fonte de Nitrogênio	1	0,02	0,025	2,01	1,42	0,167
Fonte de Nitrogênio	2	0,28	0,14	10,64	-	0,000
Erro	29	0,37	0,01	-	-	-
Total	35	0,09	-	-	-	-
Fontes de Nitrogênio						
Ureia					-1,75	0,091
Nitrato de amônio.					-2,88	0,007
Extrato de levedura					4,63	0,000

GL: Grau de liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: Quadrados médio; F: Teste de Fisher; T: Teste T de Student; P: Nível de significância

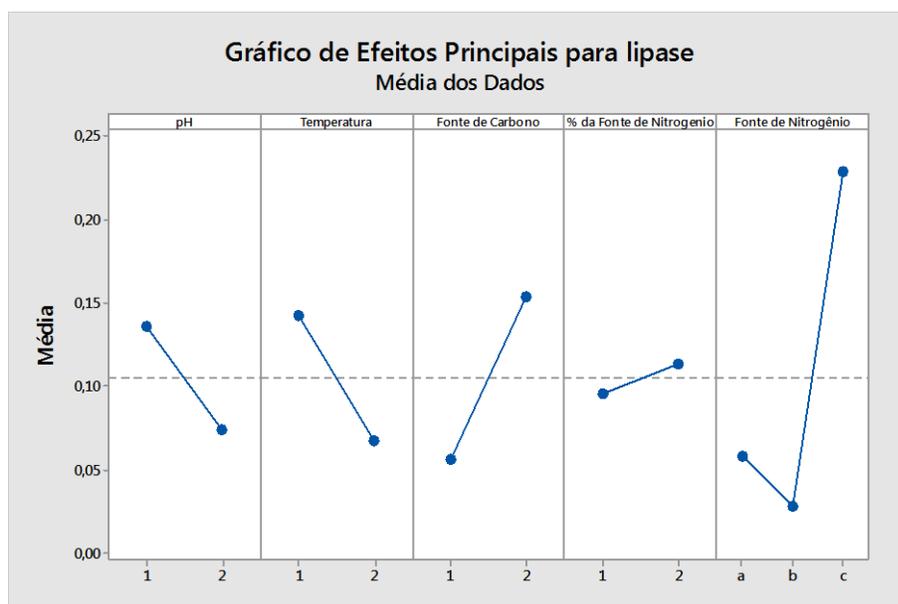


Figura 25- Gráficos de efeitos principais sobre a resposta atividade lipolítica após cultivo de *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa.

Através da análise dos valores de t de Student (Tabela 13) e do gráfico de efeitos principais para a atividade lipolítica (Figura 25), nota-se que a concentração da fonte de carbono e a fonte de nitrogênio apresentaram efeito positivo na atividade da enzima, sendo que o extrato de levedura se mostrou, dentre os suplementos, o fator mais importante para obter maiores valores de atividade lipolítica por *Penicillium* sp. M89. Os resultados encontrados em relação à fonte de nitrogênio estão em acordo com estudos que indicam que para fungos do gênero *Penicillium*, os melhores resultados podem ser obtidos com fontes orgânicas de nitrogênio, como extrato de levedura, do que com compostos inorgânicos, como o nitrato de amônio (LIMA et al., 2003).

Conforme resultados apresentados na Tabela 14, para a atividade celulásica, a variável resposta relacionada foi influenciada de forma significativa pelo fator temperatura ($p < 0,05$). Tem sido estabelecido que a secreção de extracelulares por microrganismos é substancialmente influenciada não apenas pelos componentes do meio, mas também pelas condições da cultura, incluindo a temperatura (SOHAIL et al., 2009, AGUIAR; MENEZES, 2000). Sobre este fator, Immanuel e colaboradores (2007) relataram que temperaturas de 40 e 50°C influenciaram a atividade de celulase total pelos *Aspergillus niger* e *A. fulmigatus*.

Também, Sohail e colaboradores (2009) relataram que a atividade das enzimas endoglucanase e β -glucosidase pelo *A. niger* MS82 foi drasticamente reduzida quando a temperatura da incubação foi aumentada de 30°C para 40°C.

Tabela 14: Análise de variância para a resposta, produção de celulase por fermentação submersa pelo isolado *Penicillium* sp M89 segundo delineamento fatorial fracionado misto, em 12 dias de cultivo.

Termo	GL	SQ	QM	F	T	P
pH	1	0,0001	0,0001	2,64	-1,62	0,115
Temperatura	1	0,0005	0,0005	10,70	-1,99	0,003
% Fonte de Carbono	1	0,0002	0,0002	3,35	2,91	0,078
% da Fonte de Nitrogênio	1	0,0001	0,0001	2,24	1,42	0,145
Fonte de Nitrogênio	2	0,0003	0,0001	2,66	-	0,087
Erro	29	0,002	0,0000	-	-	-
Total	35	0,001	0,0000	-	-	-
Fontes de Nitrogênio						
Ureia					1,68	0,105
N. de amônio.					-2,21	0,035
E. de levedura					0,53	0,598

GL: Grau de liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: Quadrados médio; F: Teste de Fisher; T: Teste T de Student; P: Nível de significância

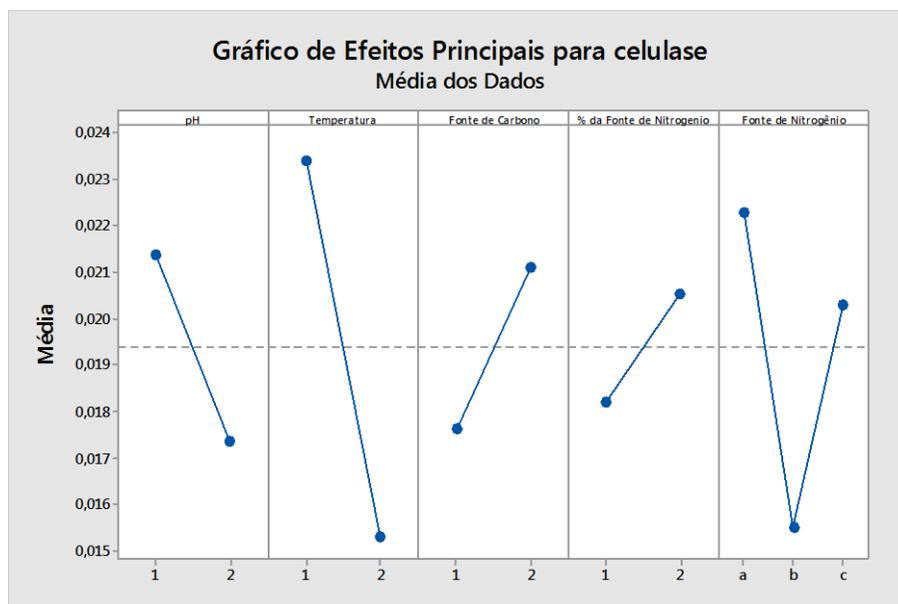


Figura 26- Gráficos de efeitos principais sobre a resposta atividade celulásica após cultivo de *Penicillium* sp.M89, em fermentação submersa.

Os resultados dos efeitos principais dos fatores (Figura 26), e os valores de T de Student (Tabela 14) mostram que a temperatura apresentou efeito negativo significativo na produção de celulases por *Penicillium* sp. M89. Resultados semelhantes foram obtidos por Schneider e colaboradores (2010), que verificaram que a temperatura de 28°C proporcionou maiores atividades celulásicas para *P. echinulatum*, e por Li, Wadso e Larsson (2009), que observaram maior atividade celulásica para *P. roqueforti* a 25°C. A variável fonte de nitrogênio não influenciou na atividade celulásica, porém, quando as fontes de nitrogênio foram avaliadas separadamente (Tabela 14), nota-se que o nitrato de amônio apresentou influência negativa significativa ($p < 0,05$) na atividade da enzima e, portanto, sua adição não é recomendada. Estudos relatam que o uso de fontes de nitrogênios orgânicas produz maiores valores de atividade celulásica por *Penicilium* sp. e *Trichoderma viride* (SAIMA, RIYAZ-UL-HASSAN, JOHRI, 2013; GAUTAM, et al., 2010)

Os modelos descritos pelo delineamento para os dados estudados são representados pelas Equações 6 e 7. Denotando, pH= a; temperatura= b; concentração da fonte de Macaúba =c; porcentagem da fonte de nitrogênio= d; fonte de nitrogênio ureia= e; fonte de nitrogênio nitrato de amônio=f; fonte extrato de levedura=g; e a constante com seu valor nominal.

$$\text{Atividade lipase (U.mL}^{-1}\text{)} = 0,10 + 0,03a + 0,03b - 0,06c^* - 0,03d - 0,05e^* - 0,08f + 0,12g^* \quad (6)$$

$$\text{Atividade celulase (U.mL}^{-1}\text{)} = 0,019 + 0,002a + 0,004b^* - 0,002c - 0,002 + 0,003e - 0,004f^* + 0,0009g \quad (7)$$

*Variáveis com valores significativos ($p < 0,05$).

Os resultados indicam que as condições de fermentação favoráveis significativas à produção de lipase não coincidem com as favoráveis para a produção de celulase. As variáveis pH e concentração da fonte de nitrogênio, apesar de não serem significativas para a produção das enzimas, proporcionou os maiores valores de atividade das enzimas em pH 5 e 2%, este fato pode ser observado por meio da Figura 27, que demonstra que a otimização dos resultados do Delineamento fatorial fracionado de níveis mistos, predizem o uso do pH

5 e a fonte de nitrogênio extrato de levedura na concentração de 2% para maximizar a produção simultânea das duas enzimas.

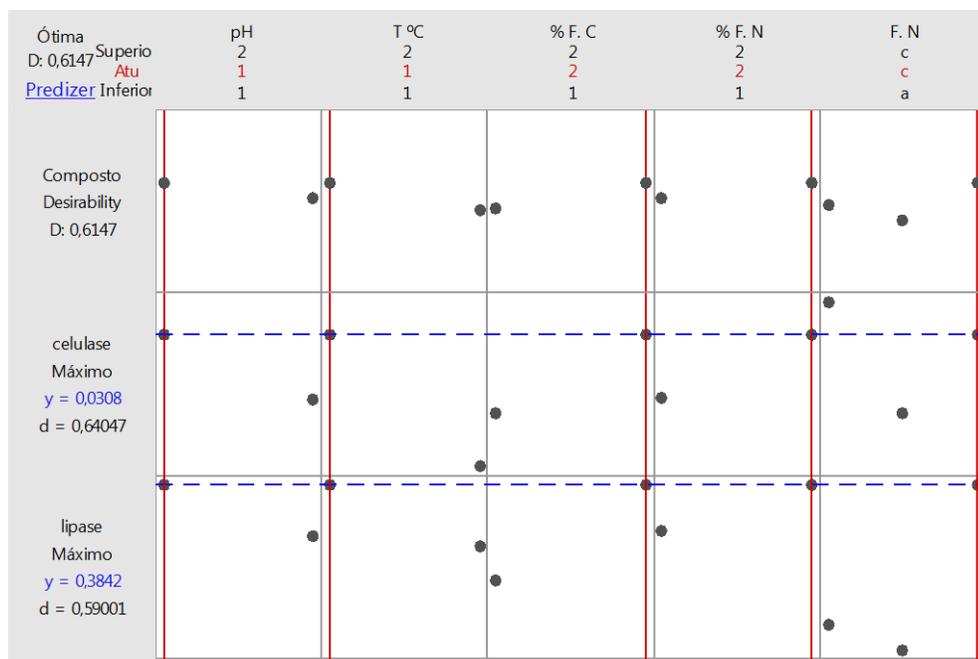


Figura 27- Condições de otimização para produção de celulase e lipase ajustada pelo modelo, após fermentação submersa por *Penicillium* sp. M89. *T= Temperatura; %F.C= porcentagem da fonte de carbono; % F.N= porcentagem da fonte de nitrogênio; F.N= Fonte de nitrogênio.

Assim, os resultados obtidos do Delineamento fatorial fracionado de níveis mistos, permitiram direcionar o planejamento experimental da segunda fase de otimização por meio de um delineamento central rotacionado (DCCR), culminando com a seguinte estratégia:

1. Manter pH 5;
2. Manter a concentração da fonte de nitrogênio à 2%;
3. Utilizar como fonte de nitrogênio o extrato de levedura;
4. Avaliar as variáveis concentração da fonte de carbono e temperatura.

5.2.3.2 Delineamento Composto Central Rotacionado

O DCCR com seis repetições no ponto central foi proposto com o objetivo de se delinear a região ótima de produção de lipase e celulase e construir modelos preditivos capazes de estimar com confiança as variáveis resposta de interesse. As Tabelas 15, 16 e 17 representam a matriz do planejamento experimental com as combinações dos fatores avaliados (valores reais) e as variáveis respostas para celulase e lipase nas unidades de atividade de UmL^{-1} , Umg^{-1} de proteína total (atividade específica), Ug^{-1} de biomassa e o crescimento celular ($\text{mg de biomassa. g de resíduo}^{-1}$), obtidas experimentalmente com 12 dias de cultivo e estimadas pelos modelos ajustados do DCCR.

Tabela 15: Fatores (valores reais) e respostas do DCCR, com seis repetições no ponto central relacionadas à atividade da lipase por *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa.

Frasco	Torta de Macaúba %	Temperatura °C	Lipase					
			UmL ⁻¹	UmL ⁻¹ Ajustado	Umg ⁻¹ de proteína	Umg ⁻¹ de proteína Ajustado	U ⁻¹ g de resíduo	U ⁻¹ gde resíduo Ajustado
1	12,50	30	0,02±0,01	0	0,47±0,1	0	0,87±0,1	0
2	7,50	20	0,11±0,01	0,06	2,33±0,3	0,93	25,50±2,0	12,38
3	7,50	30	0,14±0,13	0,15	3,24±1,9	3,48	14,97±4,4	8,23
4	2,50	30	0,01±0,01	0,24	0,37±0,3	6,46	3,66±3,7	21,68
5	7,50	30	0,08±0,05	0,15	1,87±1,3	3,48	4,36±3,1	8,23
6	7,50	30	0,05±0,02	0,15	1,21±0,5	3,48	3,03±1,8	8,23
7	7,50	45	0	0,25	0	6,52	0	27,03
8	7,50	30	0,33±0,1	0,15	7,74±1,2	3,48	9,92±5,1	8,23
9	5,00	25	0,08±0,02	0	1,83±0,5	0	3,08±0,8	2,50
10	5,00	35	0,74±0,18	0,45	19,91±6,7	12,06	73,02±17,6	44,05
11	10,00	35	0,06±0,03	0	1,47±0,5	0	8,58±2,0	0
12	10,00	25	0,02±0,01	0,13	0,46±0,3	3,19	1,02±0,6	16,07
13	7,50	30	0,14±0,09	0,15	3,34±2,1	3,48	8,87±5,5	8,23

Tabela 16: Fatores (valores reais) e respostas do DCCR, com seis repetições no ponto central relacionadas à atividade de celulase por *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa.

Frasco	Torta de Macaúba %	Temperatura °C	Celulase					
			UmL ⁻¹	UmL ⁻¹ Ajustado	Umg ⁻¹ de proteína	Umg ⁻¹ de proteína Ajustado	U ⁻¹ g de resíduo	U ⁻¹ gde resíduo Ajustado
1	12,50	30	0,07±0,02	0,06	1,47±0,38	1,50	2,75±0,56	1,77
2	7,50	20	0,02±0,01	0,04	0,48±0,21	0,80	5,28±1,39	5,85
3	7,50	30	0,08±0,01	0,06	1,87±0,23	1,56	8,26±2,09	4,46
4	2,50	30	0,03±0,01	0,05	0,91±0,21	1,36	8,93±2,46	4,18
5	7,50	30	0,05±0,02	0,06	1,21±0,39	1,56	2,68±0,81	4,46
6	7,50	30	0,06±0,003	0,06	1,52±0,16	1,56	3,57±0,58	4,46
7	7,50	45	0,02±0,001	0,03	0,33±0,08	0,48	22,94±4,49	16,63
8	7,50	30	0,07±0,02	0,06	1,72±0,19	1,56	3,74±2,22	4,46
9	5,00	25	0,07±0,01	0,05	1,52±0,06	1,09	2,58±0,20	4,34
10	5,00	35	0,05±0,02	0,03	1,21±0,50	0,89	4,94±0,62	11,58
11	10,00	35	0,04±0,01	0,05	0,99±0,26	0,96	6,29±3,23	10,26
12	10,00	25	0,06±0,01	0,05	1,37±0,30	1,21	3,16±0,90	2,25
13	7,50	30	0,06±0,02	0,06	1,46±0,46	1,56	4,04±1,52	4,46

Tabela 17: Fatores (valores reais) e respostas do DCCR, com seis repetições no ponto central relacionadas à atividade de celulase por *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa.

Frasco	Torta de Macaúba %	Temperatura °C	Crescimento celular	
			mg de biomassa.g de resíduo ⁻¹	mg de biomassa.g de resíduo ⁻¹ Ajustado
1	12,50	30	314,0±48,5	317,8
2	7,50	20	134,3±1,23	327,5
3	7,50	30	245,1±23,8	412,4
4	2,50	30	559,1±72,8	708,2
5	7,50	30	448,9±44,4	412,4
6	7,50	30	424,5±61,2	412,4
7	7,50	45	35,2±0,47	5,1
8	7,50	30	563,8±366,1	412,4
9	5,00	25	910,6±54,2	700,2
10	5,00	35	295,3±94,2	250,1
11	10,00	35	131,5±44,4	189,0
12	10,00	25	316,7±39,7	209,1
13	7,50	30	379,6±18,5	412,4

De acordo com os resultados, o uso do DCCR resultou em um aumento de até 35% na produção de lipases e até 100% na produção de celulases, em relação ao delineamento misto anterior executado. Os maiores valores de atividade lipolítica em relação a UmL^{-1} , Umg^{-1} de proteína total e Ug^{-1} de resíduo foram observadas no frasco 10, correspondendo a $0,74\text{UmL}^{-1}$, $19,91\text{Umg}^{-1}$ de proteína total e $73,02\text{Ug}^{-1}$ de biomassa, respectivamente. Para celulase, os maiores valores de atividade em UmL^{-1} e Umg^{-1} de proteína total foram observadas no frasco 3, correspondendo a $0,08\text{UmL}^{-1}$ e $1,87\text{Umg}^{-1}$. Para Ug^{-1} de biomassa o maior valor foi observado no frasco 7 de $22,94\text{Ug}^{-1}$ de biomassa. O crescimento celular foi máximo no tratamento 9, correspondendo a $910,6\text{mg}$ de biomassa/ g de resíduo.

Modelos preditivos de segunda ordem foram ajustados descrevendo a produção de lipase e celulase por *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa e o crescimento celular. A Tabela 18 mostra os modelos ajustados com coeficientes não codificados, ou seja, com os coeficientes representando os valores reais de cada fator avaliado na concentração descrita,

para serem usados para predição dos valores das respostas a partir dos valores dos níveis dos fatores selecionados. Os modelos ajustados com coeficientes não codificados é que são submetidos à validação e usados para as futuras predições e avaliações dos valores máximos da resposta. A Tabela 19 mostra os modelos ajustados com coeficientes codificados, ou seja, com os coeficientes representando a magnitude da influência de cada fator na resposta avaliada, prestando-se para o estudo e a visualização quantitativa desta influência.

Tabela 18: Modelos preditivos com coeficientes não codificados que descrevem produção de lipase e celulase por *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa.

Resposta	Modelo preditivo
	Lipase
UmL ⁻¹	$-3,7 + 0,42a * + 0,15b - 0,005a^2 - 0,001b^2 - 0,012ab *$
Umg ⁻¹ de proteína	$-99,4 + 11,27a * + 4,04 - 0,11a^2 - 0,2b^2 - 0,34ab *$
Umg ⁻¹ de biomassa	$-226 + 38a * + 6,53b - 0,2a^2 + 0,05b^2 - 1,25ab *$
	Celulase
UmL ⁻¹	$-0,30 + 0,01a + 0,02b - 0,001a^2 - 0,001b^2 * + 0,001ab$
Umg ⁻¹ de proteína	$-9,48 + 0,27a + 0,7b - 0,01a^2 - 0,01b^2 * - 0,001ab$
Umg ⁻¹ de biomassa	$77 - 1,52a - 5,1b * + 0,05a^2 + 0,1b^2 * + 0,02ab$
	Crescimento celular
Mg de biomassa.g ⁻¹ de resíduo)	$346 - 317a * + 112,2b * + 1,18a^2 - 3,22b^2 + 8,6ab *$

a= Fonte de carbono (torta de Macaúba); b= Temperatura; *= fatores significativos ($p < 0,05$)

Tabela 19: Modelos preditivos com coeficientes codificados que descrevem produção de lipase e celulase por *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa.

Resposta	Modelo preditivo
	Lipase
UmL ⁻¹	$0,15 - 0,09a * + 0,07b - 0,02a^2 + 0,002b^2 - 0,16ab *$
Umg ⁻¹ de proteína	$3,5 - 2,5a * + 1,9b - 0,3a^2 + 0,12b^2 - 4,3ab *$
Umg ⁻¹ de biomassa	$8,23 - 8,8a * + 5,18b + 0,5a^2 + 5,7b^2 - 15,6ab *$
	Celulase
UmL ⁻¹	$0,06 + 0,004a - 0,005b - 0,003a^2 - 0,02b^2 * + 0,001ab$
Umg ⁻¹ de proteína	$4,5 - 0,9a + 3,8b - 0,74a^2 + 3,4b^2 * + 0,19ab$
Umg ⁻¹ de biomassa	$1,6 + 0,05a - 0,11b * - 0,06a^2 - 0,5b^2 * - 0,01ab$
	Crescimento celular
mg.g ⁻¹ de resíduo	$412,4 - 138a * - 117,6b * + 50,3a^2 - 125,6b^2 + 107,5ab *$

a= Fonte de carbono (torta de Macaúba); b= Temperatura; *= fatores significativos (p<0,05)

No caso dos modelos ajustados para as variáveis resposta da atividade lipase em UmL⁻¹ e Umg⁻¹ de proteína e Ug⁻¹ de biomassa (Anexo 3, 4 e 5), os parâmetros estimados e os *p-values* correspondentes mostram que a variável concentração da fonte de carbono (torta de Macaúba) e a interação das variáveis independentes, fonte de carbono e temperatura, contribuíram para a resposta em um nível significativo linear com influência negativa (p<0,05) (Tabela 19). Por sua vez, a variável temperatura não apresentou influência significativa sobre a atividade da enzima.

A magnitude da influência dos fatores sobre os modelos pode ser visualizada por meio dos valores absolutos dos coeficientes codificados de cada termo (Tabela 19), e também pelos gráficos de superfície de respostas (Figura 28). Coeficientes dos termos lineares positivos indicam que aumentando os níveis dos fatores deve-se obter um maior valor da resposta, enquanto que coeficientes dos termos quadráticos negativos indicam que a elevação dos níveis dos fatores também tenderá a diminuir o valor da resposta. Os gráficos de superfície para a produção de lipase em UmL⁻¹ e Umg⁻¹ de proteína e Ug⁻¹ de biomassa, em função das concentrações da fonte de carbono e da temperatura, indicam a região ótima do modelo dentre os valores das variáveis analisadas. Entretanto, neste trabalho observa-se que o ponto ótimo

está na fronteira dos fatores analisados, sugerindo que o ótimo pode estar fora dos valores mínimos e máximos avaliados.

Em relação aos modelos ajustados para as variáveis resposta atividade celulase em UmL^{-1} e Umg^{-1} de proteína e Ug^{-1} de biomassa (Anexo 6, 7 e 8), os parâmetros estimados e os *p-values* correspondentes mostram que a variável temperatura apresentou efeito significativo sobre todas as respostas (Tabela 19), sendo o efeito quadrático significativo com influência negativa para a atividade da enzima em UmL^{-1} e Ug^{-1} de biomassa e efeito linear-quadrático significativo com influência positiva para e Umg^{-1} de proteína. De outra forma, a concentração da fonte de carbono não apresentou influência significativa sobre a atividade da enzima. Em nenhuma equação ajustada a interação das variáveis independentes foram significativas, o que mostra que não há interação entre os fatores.

Os valores absolutos dos coeficientes codificados de cada termo (Tabela 19) e os gráficos de superfície de resposta (Figura 29) mostraram que, ao encontro do que se espera, a temperatura foi o fator de influência mais acentuada sobre a atividade da enzima celulase. Os gráficos de superfície para a atividade celulásica, em função das concentrações da fonte de carbono e temperatura indicam que pôde-se encontrar a região ótima do modelo.

A otimização do processo considerando a produção simultânea das enzimas por *Penicillium* sp. M89 pode ser visualizada nas Figuras 30, 31 e 32.

A região de atividade lipolítica e celulásica em UmL^{-1} máxima ajustada pôde ser alcançada quando se utilizou valores de 3,5% para a concentração da torta de Macaúba e 33,7°C para temperatura. O valor máximo ajustado para a atividade enzimática e as condições que o proporcionaram podem ser visualizadas na Figura 30.

A região de atividade lipolítica e celulásica em Umg^{-1} de proteína máxima foi alcançada, por sua vez, após o uso de valores de 2,5% da torta de Macaúba e 34,4°C de temperatura. O valor máximo ajustado para a atividade enzimática e as condições que o proporcionaram podem ser visualizadas na Figura 31.

A região de atividade lipolítica e celulásica em Ug^{-1} de biomassa máxima ajustada foi observada quando se seleciona valores de 2,5% da torta de Macaúba e temperatura de 40°C. O valor máximo ajustado para a atividade enzimática e as condições que o proporcionaram podem ser visualizadas na Figura 32.

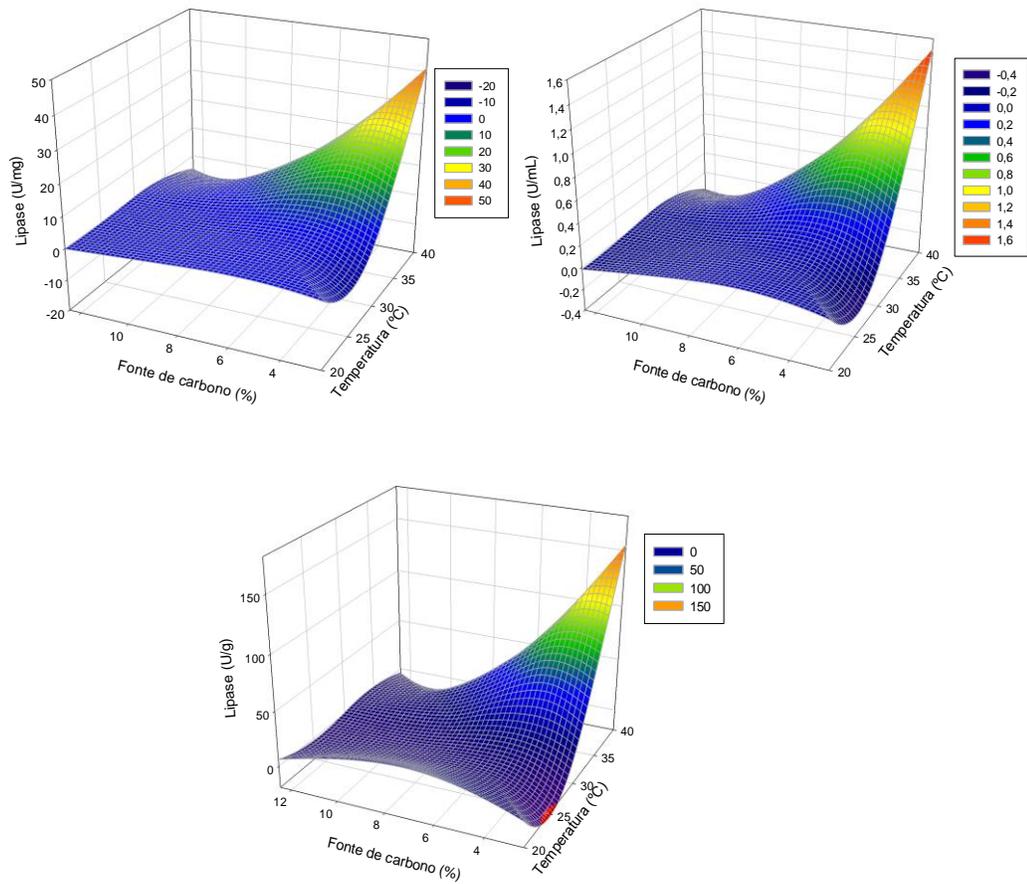
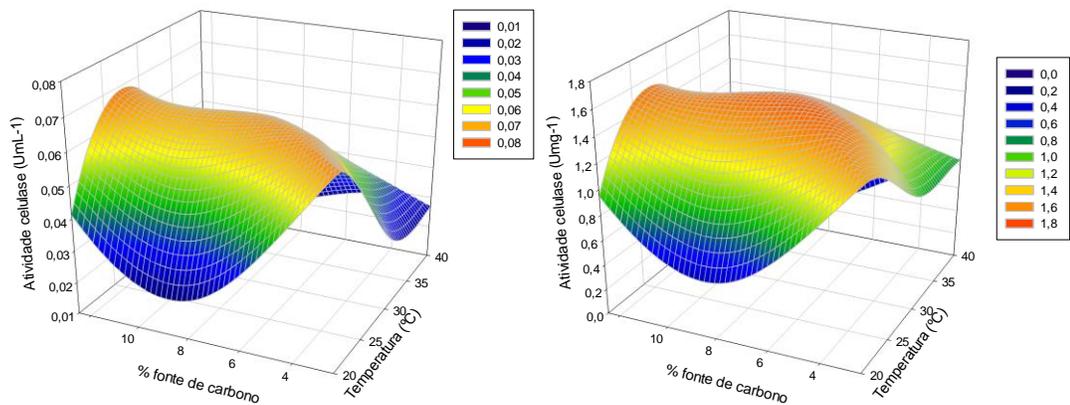


Figura 28- Gráficos de superfície de resposta dos efeitos combinados da concentração de fonte de carbono e da temperatura sobre a atividade lipolítica $U\text{mL}^{-1}$, $U\text{mg}^{-1}$ e $U\text{g}^{-1}$ ajustada, após cultivo de *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa.



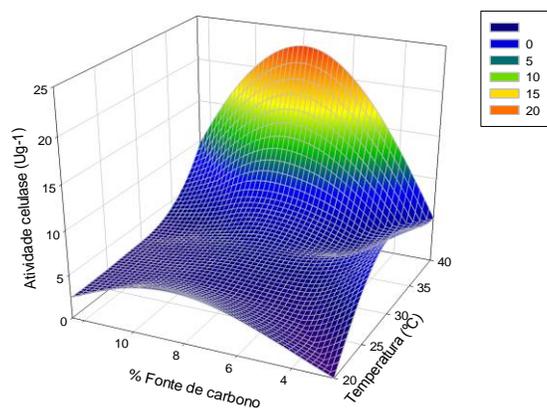


Figura 29- Gráfico de superfície de resposta dos efeitos combinados da concentração de fonte de carbono e da temperatura sobre a atividade celulásica $U mL^{-1}$, $U mg^{-1}$ e $U g^{-1}$ ajustada, após cultivo de *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa.

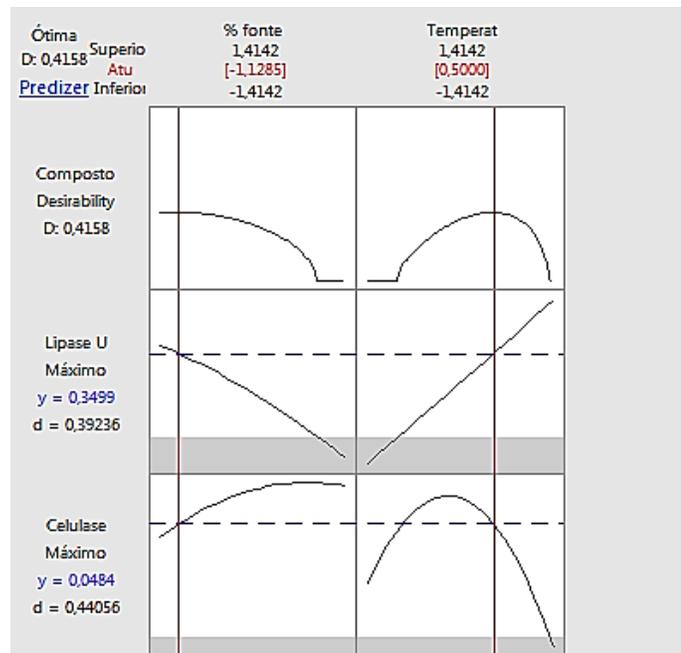


Figura 30- Condições de otimização para atividade lipolítica e celulasica UmL^{-1} ajustada pelo modelo, após cultivo de *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa.

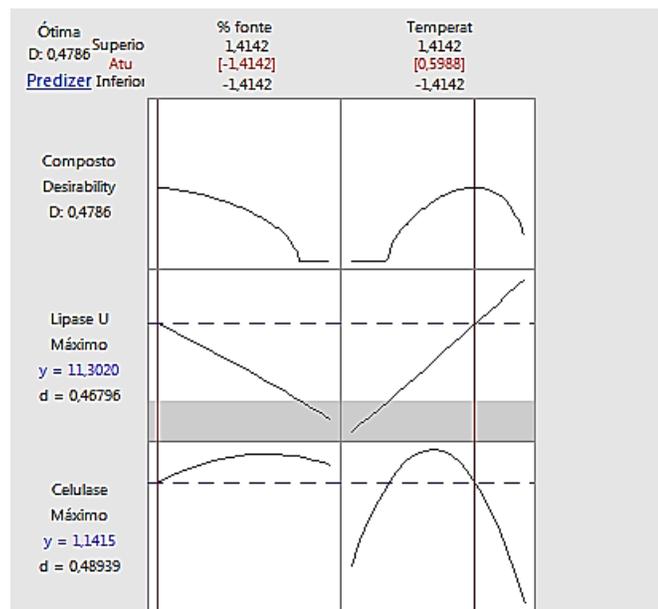


Figura 31- Condições de otimização para atividade lipolítica e celulasica Umg^{-1} ajustada pelo modelo, após cultivo de *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa.

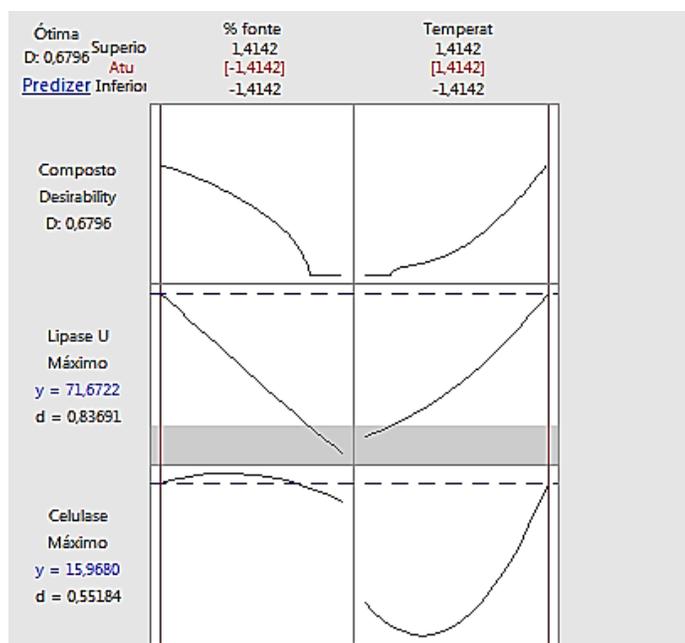


Figura 32- Condições de otimização para atividade lipolítica e celulasica Umg^{-1} ajustada pelo modelo, após cultivo de *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa.

Em relação os modelos ajustados para a variável resposta crescimento celular mg de biomassa. g^{-1} de resíduo (Tabela 19, Anexo 9), os parâmetros estimados e os *p-values* correspondentes mostram que as variáveis concentração da fonte de carbono e temperatura apresentaram efeito linear significativo sobre a resposta, com influência negativa. Adicionalmente, a interação das variáveis independentes proporcionou efeito positivo significativo no crescimento celular.

Os valores absolutos dos coeficientes codificados de cada termo (Tabela 19) e o gráfico de superfície de resposta (Figura 33) mostraram que, todas as variáveis independentes afetaram significativamente o crescimento celular. Os gráficos de superfície para o crescimento celular, em função das concentrações da fonte de carbono e temperatura indicam que o ponto ótimo está na fronteira dos fatores analisados, sugerindo que o ótimo pode estar fora dos valores mínimos e máximos avaliados.

A região de crescimento celular máxima ajustada foi obtida quando foi utilizado valores de 2,5% para a concentração da torta de Macaúba e 22,4°C para temperatura. O valor máximo ajustado para o crescimento celular e as condições que o proporcionaram podem ser visualizadas na Figura 34.

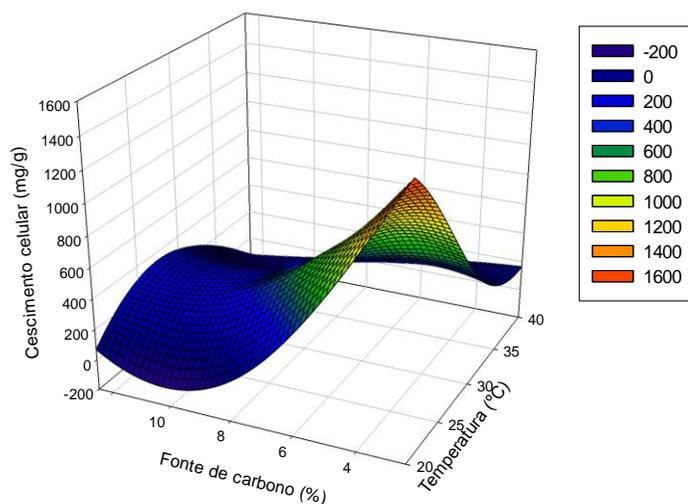


Figura 33- Gráfico de superfície de resposta dos efeitos combinados da concentração de fonte de carbono e da temperatura sobre o crescimento celular (mg.g^{-1}) ajustado, após cultivo de *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa.

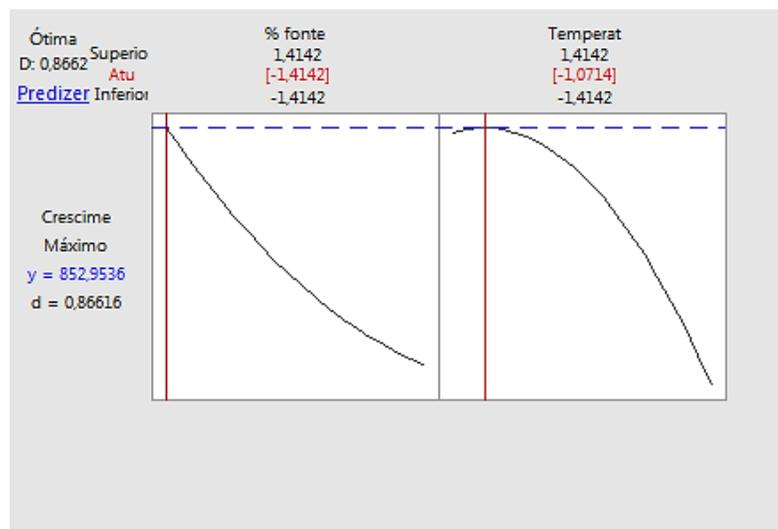


Figura 34- Condições de otimização para o crescimento celular (mg.g^{-1}) ajustado pelo modelo, após cultivo de *Penicillium* sp. M89 em fermentação submersa.

Os valores ajustados, de acordo com modelos preditivos, foram distantes dos valores reais obtidos. Isso ocorre porque o intervalo de confiança do modelo é menor em torno do ponto central, onde a predição torna-se melhor. À medida em que a condição se afasta do ponto central, o modelo perde em capacidade preditiva (BARANYI, et al. 1999). Apesar dos

modelos se mostrarem pouco relevantes para a predição nas condições ótimas para a produção das enzimas e crescimento celular, os resultados são importantes para o estudo dos efeitos dos fatores sobre as respostas.

Os resultados mostram que o uso da torta de Macaúba com fonte de carbono para a produção de lipases, celulases e biomassa celular é promissor. Esta matéria prima foi avaliada como fonte de carbono para a produção de enzimas aminolíticas em fermentação submersa por *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350, com produção otimizada usando 12% de torta de Macaúba e pH 7,0 (SILVA, 2012) e, também, para a produção de enzimas celulásicas e xilanolíticas por *Penicillium sp.*, com produção máxima na concentração de 0,5% e temperatura de 30°C. Nesse último estudo o fungo apresentou uma alta atividade da enzima endoglucanase, 250 UL⁻¹ (SANTOS, 2012).

As condições ótimas definidas para a produção das enzimas hidrolíticas se assemelham aos encontrados na literatura para a otimização das condições da produção de celulase pelo gênero *Penicillium*. No estudo de Han e colaboradores (2009), utilizando *P. Waksman* F10-2, as condições ótimas foram pH 6,4, agitação de 136,2 r / min, temperatura: 26,5°C, 20,3 g/L de palha de trigo, 11,3 g/L de peptona, 2,7 g/L de KH₂PO₄, 3,3 g/L de NaCl, e a 0,2 g/L de MgSO₄.7H₂O. Para *P. citrinum* MTCC 9620 a condição ideal para a produção de celulase (1,4 β-endoglucanase,) foi de 30 °C, pH 5,5, para farelo de trigo tratada como substrato (GHOSHAL *et al.*, 2013).

Em relação à otimização para produção de lipase, as condições ótimas definidas se diferem de alguns resultados encontrados na literatura, onde o aumento da concentração de tortas oleaginosas ocasionou o aumento da atividade da enzima. O estudo de Amin e Bhatti (2014) obteve máxima atividade lipolítica em meio contendo 10g de torta de canola como substrato para *P. fellutanum*. Para Tan e colaboradores (2004) a concentração da fonte de carbono apresentou efeito significativo, aumentando a atividade volumétrica (UmL⁻¹) da lipase de *P. camembertii*. Porém, resultados semelhantes aos do presente estudo foram obtidos por Macedo e colaboradores (2009), onde a concentração da fonte lipídica influenciou de forma negativa a produção da enzima. Adicionalmente, em estudo Lima e colaboradores (2003) obtiveram valores de 0,5% para a concentração de azeite de oliva do cultivo após otimização, onde observaram efeito negativo sobre a produção desta enzima

para quantidades superiores a 1,0% para *P. aurantiogriseum*. Contudo, destaca-se que nenhum dos trabalhos avaliou a produção simultânea das enzimas lipase e celulase.

5.3 Caracterização Bioquímica e Cinética das Enzimas

5.3.1 Caracterização da Atividade Lipolítica do Extrato Bruto Frente a Diferentes P-fenil Ésteres de Ácidos Graxos.

A especificidade da lipase produzida pelo isolado *Penicillium* sp. M89 em relação ao tipo de substrato foi investigada empregando-se ésteres de p-nitrofenil de tamanho da cadeia carbônica entre C2-C16: acetato (C2), butirato (C4), octanoato (C8), decanoato (C10), laurato (C12), miristato (C14), palmitato (C16).

Conforme Tabela 20, o perfil de especificidade da enzima em estudo variou de acordo com os ésteres avaliados, com maiores atividades enzimáticas obtidas para os substratos de cadeia longa C16 e C12 respectivamente de $0,85 \pm 0,01 \text{ UmL}^{-1}$ e $0,63 \pm 0,04 \text{ UmL}^{-1}$ ($p < 0,05$; Tukey). Os resultados indicam uma grande variação das especificidades das enzimas lipases frente a substratos com diferentes comprimentos de cadeias carbônicas (SHARMA *et al.*, 2001).

Tabela 20: Especificidade da lipase do isolado *Penicillium* sp. M89 quanto ao tipo de substrato, empregando-se ésteres de p-nitrofenil de tamanho da cadeia carbônica entre C2-C16.

Atividade Lipolítica (UmL ⁻¹)	Número de cadeias carbônicas						
	C2	C4	C8	C10	C12	C14	C16
	0,13 ±0,00 ^E	0,23 ±0,01 ^D	0,60 ±0,02 ^B	0,34 ±0,05 ^C	0,63 ±0,04 ^B	0,28 ±0,02 ^D	0,85 ±0,02 ^A

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente no nível de significância de 5% para o teste de comparação de médias de Tukey.

O estudo mostrou que a lipase extracelular produzida teve preferência pelo substrato de cadeia carbônica C16 (p-nitrofenil palmitato-pNPP) ($p < 0,05$). Este padrão pode ser atribuído à natureza hidrofóbica da molécula, a qual promove abertura da tampa, tornando os resíduos catalíticos acessíveis para o substrato e expondo superfícies hidrofóbicas na

enzima. Essas superfícies hidrofóbicas podem interagir com a interface óleo-água na emulsão aumentando a atividade enzimática (JAEGER *et al.*, 1999; ALI *et al.*, 2012). Outra possível explicação para a especificidade das lipases é atribuída a variações na geometria e tamanho do sítio ativo das enzimas (PLEISS *et al.*, 1998).

Souza e colaboradores (2014), avaliando a especificidade da lipase parcialmente purificada de *A. japonicus* LAB01 frente a diferentes ésteres acil de p-nitrofenil, com tamanhos que variam de cadeias de carbono C2 a C16: acetato (C2), butirato (C4), caprilato (C8), decanoato (C10), laurato (C12), miristato (C14), e palmitato (C16), observaram uma correlação positiva entre a atividade da enzima e o comprimento da cadeia do substrato da enzima, resultado semelhante em relação à correlação positiva foi obtido no presente estudo, com $r=0,7$ ($p<0,05$). Contudo, os autores observaram maiores atividades nos ensaios com miristato (C14), diferentemente deste trabalho.

5.3.2 Caracterização da Atividade Enzimática do Extrato Bruto Frente a Diferentes Temperaturas

A atividade lipolítica da lipase extracelular do isolado *Penicillium* sp. M89, mensurada pela liberação de para-nitrofenol (pNP) por minuto, aumentou com o aumento da temperatura até 40°C, com atividade de $1,07 \pm 0,03 \text{U mL}^{-1}$ ($p<0,05$; Tukey), conforme demonstra a Figura 35. Comportamento similar também foi encontrado por outros autores na faixa de temperatura de 20-40°C com outras espécies: *A. awamori* (BASHEER *et al.*, 2011), *Fusarium solani* (MAIA *et al.*, 2001) e; *A. japonicus* (SOUZA *et al.*, 2014).

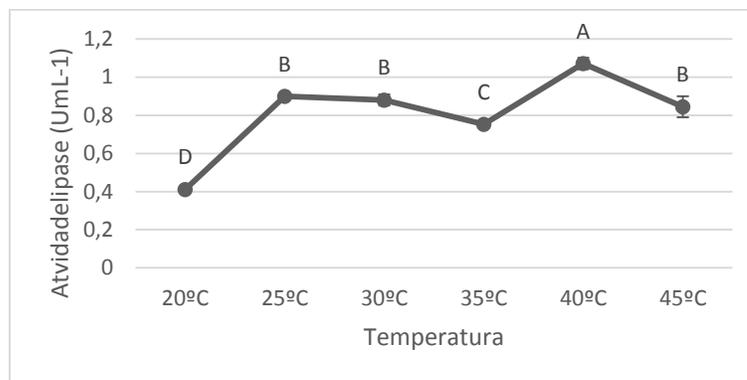


Figura 35- Temperatura ótima de atuação da lipase produzida pelo isolado *Penicillium* sp. M89. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente no nível de significância de 5% para o teste de comparação de médias de Tukey.

Sun e Xu (2008) obtiveram resultados similares quando investigaram a produção de lipase de *R. chinensis* via FES utilizando farinha e farelo de trigo com atividade máxima a 40°C e pH 8,0. De forma análoga em estudo Pastore e colaboradores (2015) para *Rhizopus* sp. com condições ótimas de atividade a 40°C e de Benjamin e Pandey (2000) para *Candida rugosa* com atividade ótima a 40°C.

Em relação a temperatura ótima da atividade da celulase, avaliaram-se as temperaturas na faixa de 15°C a 70°C com intervalos de 5°C. O perfil da atividade da enzima indica que o aumento da temperatura influenciou positivamente a atividade da celulase até a temperatura de 45°C, sendo o ótimo da atividade de $0,074 \pm 0,003 \text{ UmL}^{-1}$ ($p < 0,05$; Tukey) conforme apresentado na Figura 36. A temperatura igual ou acima de 50°C, influenciaram negativamente a atividade da celulase.

Resultados similares foram obtidos nos estudos de Lowe e colaboradores (1987), Emtiazi e colaboradores (2000) com *Cellulomonas* sp e *Neocallimastix* sp, respectivamente, ou seja, atividade ótima de celulase a 45°C. Cysneiros e colaboradores (2015), avaliando a produção de celulases pelo fungo *Humicola grisea*, encontraram a temperatura ótima para a celulase na faixa de 40-50°C.

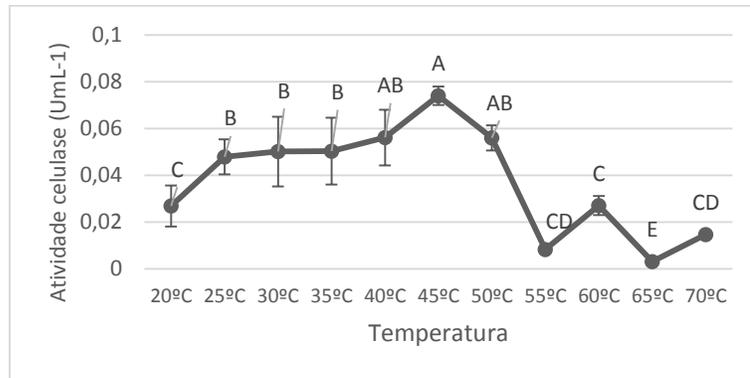


Figura 36 - Temperatura ótima de atuação da celulase produzida pelo isolado *Penicillium* sp. M89. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente no nível de significância de 5% para o teste de comparação de médias de Tukey.

5.3.3 Caracterização da Atividade Enzimática do Extrato Bruto Frente a Diferentes Valores de pH.

O perfil de pH para a atividade da lipase, foi avaliado na faixa de 3,0-10,0, com os seguintes tampões (0,09 mol/L): citrato-potássio pH 3,0-6,0, de Tris-HCl para pH 6,0- 8,0 e Glicina para pH 9,0-10,0.

A atividade enzimática máxima para a lipase do isolado *Penicillium* sp. M89 foi obtida em pH 8,0, de $0,94 \pm 0,001 \text{ U mL}^{-1}$ ($p < 0,05$; Tukey). A diminuição na atividade enzimática verificada pode ser atribuída a menor afinidade da enzima pelo substrato na faixa de pH estudada ou a efeitos do pH na estabilidade da enzima (DIXON *et al.*, 1979). Os dados obtidos podem ser visualizados na Figura 37.

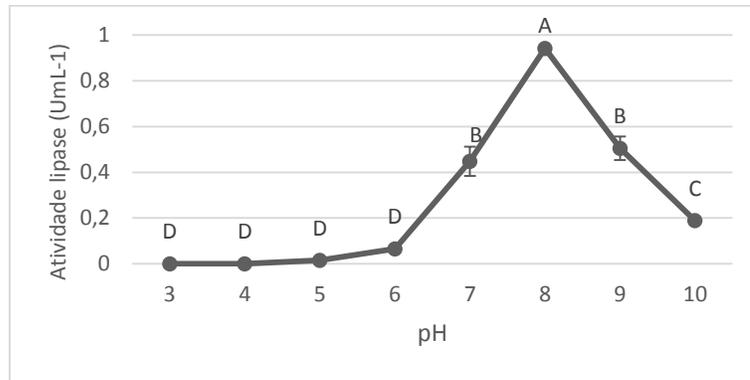


Figura 37- pH ótimo de atuação da lipase produzida pelo isolado *Penicillium* sp. M89. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente no nível de significância de 5% para o teste de comparação de médias de Tukey.

Em relação ao perfil de pH para a atividade da celulase, o mesmo foi determinado na faixa de 3,0-10,0, com os seguintes tampões (0,05 mol/L): citrato-potássio pH 3,0-5,0, de fosfato de sódio para pH 6,0- 7,0 e Tris-HCl para pH 8,0-10,0. A atividade máxima foi obtida com pH 5 na temperatura de 45°C, porém sem diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de comparação de médias (Tukey), conforme Figura 38. O valor máximo de atividade enzimática observado no pH 5,0 (condição ótima de atuação) correspondeu a $0,050 \pm 0,011$ UmL⁻¹.

Dados este, de acordo com a literatura, que preconizam pH em torno de 5,0 como metodologia padrão para quantificação da atividade de celulases (GHOSE, 1987; FACHINNI, 2010).

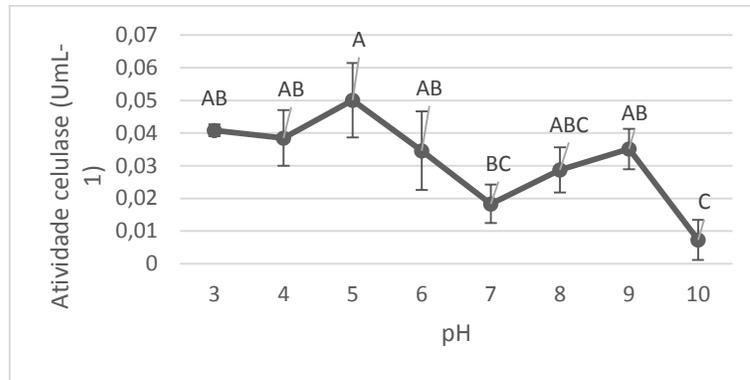


Figura 38 - pH ótimo de atuação da celulase produzida pelo isolado *Penicillium* sp. M89. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente no nível de significância de 5% para o teste de comparação de médias de Tukey.

6 CONCLUSÕES

A prospecção de isolados de fungos filamentosos isolados de frutos de Macaúba permitiu a seleção de cinco isolados, *Cladosporium cladosporonoides* M19, *Fusarium proliferatum* M62, *Penicillium* sp. M89, *Fusarium* sp. M184 e *Fusarium* sp. M233, promissores para a produção de lipase, celulase a partir da torta da Macaúba, uma vez que os resultados indicaram que a adição da torta no meio de cultura aumentou a produção de celulases em comparação com os ensaios quantitativos em meio específico para a produção da enzima.

O estudo da produção de protease permitiu observar que esta não interferiu na produção de lipase e celulase para os isolados *C. cladosporonoides* M19, *F. proliferatum* M62, *Fusarium* sp. M184. A exceção, ocorreu apenas para o isolado *Penicillium* sp. M89 na concentração de 2,5% de torta em relação a produção de lipase, e para o isolado *Fusarium* sp. M233, nas concentrações de 5% e 10% de torta na produção de celulase, onde houve uma associação inversa (negativa) significativa entre a produção de protease e lipase ($p < 0,05$).

O isolado *Penicillium* sp. M89 se mostrou um bom produtor de lipases e celulases e foi selecionado para os ensaios de otimização da fermentação da torta de Macaúba. A análise de níveis mistos mostrou que a produção de lipase é influenciada significativamente pela concentração da torta de Macaúba e pela fonte de nitrogênio, enquanto que a produção de celulase é afetada significativamente pela temperatura. O DCCR permitiu definir as condições ótimas de produção simultânea das duas enzimas testadas,

Os modelos do delineamento de níveis mistos e o DCCR utilizados foram úteis para o estudo do processo de otimização da produção das enzimas lipase e celulase por fermentação submersa utilizando torta de Macaúba como substrato, sendo que o DCCR resultou em um aumento de 35% na produção de lipase e 100% na produção de celulases, abrindo perspectivas para a otimização do processo de fermentação utilizando a torta de Macaúba.

A caracterização do extrato bruto mostrou que atividade da lipase foi maior na temperatura de 40°C e pH 8, sendo o p-nitrofenol palmitato (C16), o substrato ótimo. Para a atividade da celulase temperatura ótima de 45°C e pH 5.

A utilização do resíduo, proveniente da extração lipídica da polpa de Macaúba, como fonte de carbono em processos de fermentação por fungos filamentosos para a produção de

lipases e celulases pode agregar valor a este coproduto, uma vez que a Macaúba é uma oleaginosa promissora com grande potencial de uso na produção de óleo e biomassa com possibilidade de uso nos setores de alimentos, energia, cosméticos e fármacos. O estudo também abre perspectivas de novos estudos relacionados ao aproveitamento da torta de Macaúba para produção de hidrolases por processos de baixo custo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Bioprospecting thermophiles for cellulose production: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 844-856, 2012.

AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.B.J. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. B CEPPA, Curitiba, v.18, n.1, p. 57-70, 2000.

AGRAWAL, D., PATIDAR, P., BANERJEE, T., PATIL, S. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 977-981, 2004.

AHAMED A.; SINGH, A.e WARD, O.P. Culture-based strategies for reduction of protease activity in filtrates from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. n.21, p.1577-1583, 2005.

AHAMED, A. E VERMETTE, P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. v. 42, p. 41-46, 2008.

AIELLO, C.; FERRER, A.; LEDESMA, A. Effect of alkaline treatments at various temperatures on cellulase and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM 9414. *Bioresour. Technology*, 1996.

ALEXANDRINO, A. M. *et al.* Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 02, p. 364-368, 2007.

ALI, M. S. M. *et al.* Purification and Characterisation of an F16L Mutant of a Thermostable Lipase. *Protein Journal*, v. 31, p. 229-237, 2012.

ALMEIDA, S.P. Cerrado: aproveitamento alimentar. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p.188, 1998.

ALMEIDA, M. N. Complexo celulolítico e hemicelulolítico do fungo endofítico *Fusarium verticillioides* e sua aplicação para sacarificação do bagaço de cana. Orientador: Sebastião Tavares de Rezende. Coorientadores: Valéria Monteze Guimarães e Olinto Liparini Pereira. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013.

AMIM, M.; BHATTI H. N. Effect of physicochemical parameters on lipase production by *Penicillium fellutanum* using canola seed oil cake as substrate. *International Journal of Agriculture and Biology*, v.16, p.118-124, 2014.

AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. 6. ed. AOAC International, 2011.

ARAÚJO, A. R. Onde canta o sabiá: Pesquisas revelam potencialidades industriais do fruto da Macaúba, palmeira nativa do cerrado. Boletim Informativo UFMG, v.36, n.1706, 2010.

ANTHONY, T., *et al.* Inhibition of proteases during fermentation improves xylanase production by alkali tolerant *Aspergillus fumigatus* ARI. Journal of Bioscience and Bioengineering, v.96, n. 4, p.394-396, 2003.

BARANYI, J., PIN, C. & ROSS, T. Validating and comparing predictive models. Int. J. Food Microbiol. 48, 159–66 (1999).

BASHEER, S. M. *et al.* Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment. New Biotechnology, v. 28, 2011.

BEG, Q. K., *et al.* Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 56, n. 3/4, p. 326-338, 2001.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid-state fermentation. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 44, p. 213-221, 2000.

BERNARDI, D.L.S.; PILOSOFF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. Journal of American Oil Chemists's Society, Champaign, IL, v.68, n.2, p.102- 105,1991.

BHANU PRAKASH, G.V.S.; PADMAJA. V.; SIVA KIRAN, R. R. 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.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances, n.18, p. 355–383, 2000.

BIER, M. "Lipases". Methods Enzymology, v.1, p. 627-651, 1955.

BOLLÓK, M.; RÉCZEY, K. Cellulase enzyme production by various fungal strains on different carbon sources. Acta Alimentaria, 2000.

BON, E. P. S.; PEREIRA JÚNIOR, N. Tecnologia Enzimática. Rio de Janeiro, 1999.

BON *et al.* Lipases em biocatálise *in* Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. Interciência, Rio de Janeiro, 2008.

BON, E. P. S. Enzimas industriais: política e gestão. V Seminário brasileiro de biotecnologia enzimática, Brasília. Resumos... Brasília, DF, 2002.

BORNSCHEUER, U. T. *et al.* Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. Trends in Biotechnology, v. 20, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADY, L. *et al.*, A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase”, Nature, v. 343, p. 767-770, 1990.

BRAGA, G.U.L.; DESTEFANO, R.H.R.; MESSIAS, C. L. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. Revista Microbiologia., São Paulo , v. 30, n. 2, p. 107-113, 1999.

BRAGA, R. M *et al.* Seleção de cepas de *Fusarium* produtoras de celulase. Anais da XIII Semana universitária da UECE, Fortaleza, 2008.

BRANDÃO, A. A., *et al.* Caracterização biométrica de frutos de Macaúba em diferentes estágios de maturação, provenientes de duas regiões do estado de Minas Gerais. Global Science and Technology, Rio Verde, v. 07, n. 02, p.15 -23, 2014.

BRASIL. Alimentos Regionais Brasileiros. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde, p.140, 2002.

BRESCIANI, F. R. Otimização da produção de lipase por *Luteibacter* sp. e caracterização do potencial biotecnológico. Monografia (Bacharelado Ciências Biológicas), Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2011.

BROCKAM, H.L. "General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches". In: Borgstrom, B. e Brockman, H.L. (Eds). Lipases. Elsevier Science Publishers, p.1-46, 1984.

BUENO, et al. Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. Tropical Plant Pathology, v.5, n.34, 2009.

CAMBRAIA, *et al.* Análise da produção de exoenzimas :amilase, pectinase, xilanase, protease e lipase por fungos isolados de frutos de Macaúba (*Acrocomia aculeata*). In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Anais do XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. Carbohydrate Research. v. 337, p. 1291-1296, 2002.

CARNEIRO, H.; PEREIRA, J.C. Macaúba: subprodutos de biodiesel na alimentação animal. Panorama do Leite, n.29, 2009.

CASTELLANI A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1939.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. Química Nova, v. 33, n. 1, p.181-188, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000100031&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 02 out. 2014.

CASTRO, A. M, *et al.* Cellulases from *P. funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, v.37. p.151-158, 2010.

CASTRO, A. M.; Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos, obtidas a partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp). Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos -, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

CASTRO, H. F. D.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. D. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. Química. Nova, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CASTRO-OCHOA, L.D., *et al.* Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. Enzyme Microbial Technology, v. 37, p. 648-654, 2005.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. Journal of Biological Chemistry, v. 23, p. 501-505, 1947.

CHINAGLIA, *et al.* Biochemistry of lipolytic enzymes secreted by *Penicillium solitum* and *Cladosporium cladosporioides*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v.78, n.2, p.245-254, 2014

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2. ed. Lavras: ESAL/FAEPE, 2005

CICONINI, G., *et al.* Biometry and oil contents of *Acrocomia aculeata* fruits from the Cerrados and Pantanal biomes in Mato Grosso do Sul, Brazil. Industrial Crops and Products, Amsterdam, v. 45, p. 208-214, 2013

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 22, p. 881–885, 2006.

CONTESINI, F.J., *et al.* *Aspergillus* sp. lipases: potencial biocatalyst for industrial use. *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67, p. 163, 2010.

CORRÊA, T. L. R., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Janeiro, 2009. Produção simultânea de α -amilase e proteases pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 termofílico e aplicação destas enzimas em formulações de detergente.. Tese (Doutorado) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2009.

CYSNEIROS, Cristine dos Santos S. *et al.* Produção, caracterização e avaliação de enzimas fibrinolíticas na digestibilidade na forragem de milho. *Ciência Animal Brasileira*, v. 14, n. 4, p. 426-435, 2013. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/19491/15627>>. Acesso em: 11 Mar. 2015.

CUNHA, F. M. Desenvolvimento de processo não-convencional para produção de celulases por *Aspergillus niger* em biorreator pneumático na presença de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 2011.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v.27, n.4, p.623-630, 2004.

DALMAU, E., *et al.* Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbiol Technology*, v. 26, p. 657-663, 2000.

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

DESVAUX, M. The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 37, n. 4, p. 373-385, 2005.

DIORIO, L. A., *et al.* Development of a bioreactor system for the decolorization of dyes by *Corioliolus versicolor* f. *antarcticus*. *Chemosphere*, v. 72, n.2, p.150-156, 2008.

DIXON, M. Webb EC. *Enzyme kinetics in: Enzymes*, 3ed. Academic, New York, 1979.

DUTRA, J. C. V. Produção de lipase por *Aspergillus niger* 11T53A14 através de fermentação em estado sólido para a síntese de biodiesel. Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química. 87 p. 2007.

D'ANNIBALE, A., SERMANI, G.G., FEDERICI, F., PETRUCCIOLI, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 15, p. 1828-1833, 2006.

EDEM, D.O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological and toxicological aspects: a review. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 57, p. 319-341, 2002.

ELLAIHAH, P., *et al.* Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, v. 39, p.525-528, 2004

EL-DIASTY, E.M.; SALEM, R.M. Incidence of lipolytic and proteolytic fungi in some milk products and their public health significance. *Journal of Applied Science Research*, v.3, p.1684- 1688, 2007.

EL RASSY, H.; PERRARD, A.; PIERRE, A. C. Application of lipase encapsulated in silica aerogels to a transesterification reaction in hydrophobic and hydrophilic solvents: Bi-Bi Ping-Pong kinetics . *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*. v.30; p.137-150, 2004.

EL TAYAR, N. *et al.* Percutaneous of drugs: a quantitative structure-permeability relationship study. *Journal of Pharmaceutical Science*, Hoboken, v. 80, n. 8, p. 744-749, 1991.

EMTIAZI, G.; NAHVI, I.; Multi-enzyme production by *Cellulomonas* sp. grown on wheat straw. *Biomass and Bioenergy*, v. 19, p. 31-37, 2000.

ERICSSON, D. J., *et al.* X-ray structure of *Candida antarctica* lipase: A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. *Journal of molecular biology*, v. 376(1), p.109–19, 2008.

ERIKSSON, K-E.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. *Springer Series in Contemporary Bioscience*, 1990.

ERNANDES, F. M. P. G.; BOSCOLO, M. e CRUZ, C. H. G. Influência da composição do meio para a produção de *Zimomonas mobilis*. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 32, n. 1, p.21-26, 2010.

FACCHINI, F. D. A. Bioprospecção e produção de enzimas fibrolíticas por *Aspergillus japonicus* com potencial para aplicação em nutrição de ruminantes. 2010. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

FAHEINA, J. S. G. Produção de celulases por fermentação submersa utilizando microrganismos prospectados em coleções de culturas nacionais. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2012.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 03 de outubro de 2014.

FARIAS, M. A., *et al.* Viabilidade da técnica de produção de lipase pela levedura *Yarrowia lipolytica* em fermentação em estado sólido utilizando torta de Macaúba. *Cobeq*, Búzios, RJ. 2012.

FAVARO, S. P. Aproveitamento de espécies nativas e seus coprodutos no contexto de biorrefinaria / Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 38 p., 2013.

FEITOSA, I.C; FELBER, A.C. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados com histórico de contato com petróleo. *Acta Scientiarum Technology*, v. 32, n. 1, p. 27-31, 2010.

FERNANDES, M. L. M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, (Tese de Doutorado), 2006.

FILÓ L.E.C., POLIZELI M.L.T.M., PEREIRA M.G. Aumento da produção de lipases extracelulares do fungo *Trichoderma pseudokoningii* em fermentação em estado sólido In: 21º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

GALVANI, F.; SANTOS, J.F. Estudo do Efeito da Temperatura de Secagem sobre Alguns Parâmetros Nutricionais da Polpa e da Farinha de Bociúva. In: Simpósio sobre recursos naturais e socioeconômicos do pantanal, Corumbá. Anais... Corumbá: 2010.

GAUTAM S.P., *et al.* Optimization of the medium for the production of cellulase by the *Trichoderma viride* using submerged fermentation. *International of environmental sciences*, v.1, n.4, 2010.

GAO, J., *et al.* Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*. v. 99, p. 7623–7629, 2008.

GAO, Y.; BREUIL, C. Extracellular lipase production by a sapwood-staining fungus *Ophiostoma piceae*. *World J. Applied Microbiology and Biotechnology*, v.11, p.638-42, 1995.

GERMANO, S., *et al.* Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbiology Technology*, v. 32, p.246–251, 2003.

GHANEM, A., ABOUL-ENEIN, H.Y. Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality* 17, 1-15, 2005.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, p. 257–268, 1987.

GHOSHAL, G; BANERJEE U. C.; SHIVHARE, U. S. Optimization of Cellulase (E.C. 3.2.1: 4) Production Using *Penicillium citrinum* MTCC 9620 in Solid State Fermentation. *British Biotechnology Journal*, v. 3, 2013.

GLATZ, C.E. Precipitation. In: Bioseparation and bioprocessing a handbook. Ed: New York: Marcel Dekker, v. 2, p. 329-356, 1998.

GODOY, M.G., *et al.* Use of a low-cost methodology for biotransformation of castor bean waste and lipase production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 44, p. 317-322, 2009.

GOMIDE, F. T. F. Otimização de produção, purificação e caracterização parcial de lipases produzidas pela levedura *Moniliella spathulata* R25L270. Dissertação (Mestrado). Departamento de Bioquímica e Imunologia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

GONG, C. S.; TSAO, G. T. Cellulase and biosynthesis regulation. *Annual Reports on Fermentation Processes*, 1979.

GOTOR, V. Lipases and (R)-oxynitrilases: useful tools in organic synthesis. *Journal of Biotechnology*, v. 96, n. 1, p. 35-42, 2002.

GRBAVCIC, S. Z., *et al.* Effect of fermentation conditions on lipase production by *Candida utilis*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, v.72, p.757-65, 2007.

GUPTA, R.; BEG, Q.K. Bacterid alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiol Biotechnol*, Berlin, v.59 p. 15-32, 2002.

GUPTA R, GUPTA N, RATHI P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties *Applied and environmental microbiology*. v.64, p.763-781, 2004.

GUNASEKARAN, G.; KOTAY, S. M.; DAS, D. Alkaline lipase production by *Citrobacter freundii* IIT-BT L139. *Indian J. Exp. Biol.*, v. 44, p. 485-491, 2006.

GUSAKOV, A. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology*, v. 29, n. 9, p. 419-425, 2011.

HAN, L.; J. FENG, J.; ZHU, C.; ZHANG, X. Optimizing cellulase production of *Penicillium waksmanii* F10-2 with response surface methodology *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n.16, p. 3879-3886, 2009.

HARTMEIER, W. Immobilized biocatalysts: an introduction. Springer Verlag. Berlin, 1988.

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

HENDY, N. A.; WILKE, C. R.; BLANCH, H. W. Enhanced cellulase production in fedbatch culture of *Trichoderma reesei* C30. *Enzyme Microbiology Technology*, 1984.

HIANE, P.A., *et al.* Chemical and nutritional evaluation of kernels of bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.3, p.683-689, 2006.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.64, p.175-186, 2004.

HOSHINO, T., *et al.* Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. v.56, p. 660-664, 1992.

HOSSEINPOUR, M.N., *et al.* Submerged culture studies for lipase production by *Aspergillus niger* NCIM 584 on soya flour. *Middle-East Journal of Scientific Researc*, v.7, p. 362–366, 2011.

IFTIKHAR, T., *et.al.* Production of extracellular lipases by *Rhizopus oligosporus* in a stirred fermentor. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 1124, 2010.

ILLANES, A., GENTINA, J. C. E MARCHESE, M. P. Production and stabilization of cellulases from *Trichoderma reesei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* v. 4, n. 4, p.407-414, 1988.

IMMANUEL, G., *et al.* Production and Partial Purification of Cellulase by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus* Fermented in Coir waste and Sawdust. *The Internet Journal of Microbiology*. v. 3, n.1. p.1-12, 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T.. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-dimensional structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annual Review of Microbiology*, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K. E., *et al.* Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Federation of European Biochemical Societies*, v. 332, n. 1/2, p. 143-149, 1993.

JAEGER, K.-E., E EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, v.13, n.4, p.390–397, 2002.

JENSEN, R. G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids*, v. 18, p. 650-657, 1983.

JORGENSEN, H. *et al.* Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. *Enzymes and Microbial Technology*, v.36. p.42-48, 2005.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.

KANG, S. W., *et al.* Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. v. 91, p. 153–156, 2004.

KAPOOR M., GUPTA, M.N. Lipase Promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry* v. 47, p.555- 569, 2012.

KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Current Trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology*, v. 6, p. 41-53, 2011.

KATO-MAEDA, M.; GAO, Q.; SMALL, P.M. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. *Cellular Microbiology*, v.3, n.11, p.713-719, 2001.

KEMPKA, A. P. *et al.* Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 31, n. 1, p. 119-125, 2008.

KIELING, D. D. Enzimas: Aspectos gerais. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2002.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, Amsterdam, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KOBLITZ, M. G. B. Bioquímica dos alimentos: teoria e prática. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2010.

KOCHER, G.; KALRA, K.; e BANTA, G. Optimization of cellulase production by submerged fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* Rut-C 8230. *The Internet Journal of Microbiology*, v5, n. 2, 2007.

KRISHNA, S.H.; KARANTH, N.G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A Kinetic study. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1547, p. 262-267, 2001.

KULA, M.-R.; KRONER, K.; HUSTEDT, H. Purification of enzymes by liquidliquid extraction *Reaction Engineering*. Springer Berlin / Heidelberg, v.24, n.1, p.73- 118., 1982.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial view point. *Biotechnology Advances*, Oxford, v.17, p. 561-594, 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. São Paulo: Sarvier, 1995.

LEOPOLD, I., FRICKE, B. Inhibition, reactivation, and determination of metal ions in Membrane metalloproteases of bacterial origin using high-performance liquid

chromatography coupled on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, v.252, p.277-285, 1997.

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

LI, Y; WADSÖ, L; LARSSON, L. Impact of temperature on growth and metabolic efficiency of *Penicillium roqueforti*--correlations between produced heat, ergosterol content and biomass. *Journal of Applied Microbiology*, v.106, n.5, p.1494-501, 2009

LI, N.; ZONG, M.H. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, p. 43, 2010

LI, Q.; HARVEY, L.M.; McNEIL, B. The effects of bioprocess parameters on extracellular proteases in a recombinant *Aspergillus niger* B1-D. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.2, n.78, p.333-341, 2008.

LIMA, R. C.; SILVA, H. N. L.; PINOTTI, L. M.; Produção de lipases por *Penicillium* sp. In: Anais X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica “Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”, Rio de Janeiro, Brasil, 2013.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). *Biotecnologia industrial -processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., p. 351-362, 2001.

LIMA, V.M.G., *et al.* Effect of carbon and nitrogen sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technology and Biotechnology*, v. 41, p. 105–110, 2003.

LORENZI, G. M. A. C. *Acrocomia aculeata* (Lodd.) ex Mart. – Arecaceae: Bases para o extrativismo sustentável. Curitiba. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, 2006.

LORENZI, H., *et al.* *Palmeiras do Brasil: exóticas e nativas*. Nova Odessa: Editora Plantarum, p. 1-20, 1996.

LORENZI, H.; *et al.* *Palmeiras Brasileiras e Exóticas Cultivadas*. Nova Odessa- SP, Ed. Plantarum, 432 p., 2004.

LOWE, S.E.; THEODOROU, M.K.; TRINCI, A.P.J.; Cellulases and xylanase of an aerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, n. 6, p. 1216-1223, 1987.

LYND, L.R. *et al.* *Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

LYND, L.R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 77, n. 4, p. 467-475, 2002.

MACEDO, L. N., *et al.* Estudo da Influência de variáveis de processo na produção de lipases por fungos filamentosos. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal, p. 1-6, 2009.

MAEDA, R. N. Produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa de bagaço de cana pré-tratado e sua aplicação na produção de etanol de segunda geração. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresource Technology*, v. 99, p.1729–1735, 2008.

MAIA, M. *et al.* Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource Technology*, v.76, p.23–27, 2001.

MARCO, É. G. de. Produção e caracterização de celulase produzidas por um isolado de *Bacillus* sp. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, 2012.

MARTIN C, *et al.* Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural residues for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* v.137-140, n. 1-12, p. 339-52, 2007.

MARTINS, R. E. Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, 2007.

MATOS, I. V., *et al.* Caracterização bioquímica da Lipase obtida por fermentação submersa de *Geotrichum candidum*. In: 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica. Universidade de São Paulo. São Paulo. Disponível em: <<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=3924&numeroEdicao=19>>. Acesso: 03 de nov. 2014

MEIER, R. *et al.*. A calcium-gated lid and a large beta-roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(43), p.31477–83, 2007.

MEINHARDT, S., *et al.* Purificação de amiloglucosidase em sistema aquoso bifásico. In: Simpósio nacional de bioprocessos. Recife, 2005.

MENEZES, T. J. B., DE LAMO, P. R., ARAKAKI, T. Produção do complexo celulolítico C1, Cx por microrganismos. *Coletânea do ITAL*, v. 7, p. 91-96, 1976.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31: p. 426-428, 1959.

MINITAB. Minitab for Windows [Minitab-Inc, USA] Versão 16. English Ink Copyright [C], 2010.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solidstate bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, v. 68, p. 61- 138, 2000.

MITIDIERI, S *et al.* Produção de protease para formulação de detergentes biodegradáveis. In: V Seminário brasileiro de biotecnologia enzimática, Brasília, DF, 2002.

MONTGOMERY H.J., *et al.* Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses *Soil Biology & Biochemistry*, 2000.

MOREIRA, J. M. M. A. P.; SOUSA, T. C. R. de. Macaúba: oportunidades e desafios. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2009 Disponível em: 54<<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/163/>>. Acesso em 18 Jan. 2013.

MORETTO, E.; FETT, R. Tecnologia de Óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos, Ed. Livraria Varela, São Paulo, 1998.

MOURA, L. F. W. G. *et al.* Bioprospecção de atividade lipolítica de fungos anemófilos isolados do cantro vocacional tecnológico de Tauá-CE. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.15, n.2, p.157-165, 2013.

MURUCI, L. N. M., - Produção e caracterização de lipase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação no estado sólido utilizando resíduos da agroindústria. Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2012.

MURUGAN, S., *et al.* Production of xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 using saw dust as substrate under solid state fermentation. *Enzyme Research*, v. 2011, p. 1-7, 2011.

MUSHIMIYIMANA, I. e TALLAPRAGADA, P. Optimization of process parameters for biosynthesis of cellulose by *Cladosporium Cladosporonoides* using agro wates. *International Journal of pharma and bio sciences*; v.4, n.4, p.1129-1138, 2013.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas - Poderosa ferramenta na indústria. *Revista Ciência Hoje*. v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C.; ANDERSON-COOK, C.M. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. Wiley ,2009.

NTHANGENI, M.B., *et al.* Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: A comparative report on Bacillus lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v.28 p. 705-712, 2001.

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

NUCCI, S. M. Desenvolvimento, caracterização e análise da utilidade de marcadores microssatélites em genética de população de Macaúba. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico, Campinas-SP, 2007.

O'BRIEN, R. D. *Fat and oils: formulations and Processing for Applications*. Lancaster, Second Edition, 1998.

O'DONNELL, D., *et al.* Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. *Biochemical Engineering Journal*, v.3, n.8, p.187-193, 2001.

OLEMPSKA-BEER, Z.S. *et al.* Food-processing enzymes from recombinant microorganisms - a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.45, p.144-158, 2006.

OLIVEIRA, M. M. DE, *et al.* Isotermas de dessecção da casca do maracujá (*Passiflora edulis Sims*): determinação experimental e avaliação de modelos matemáticos. *Revista Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.5, p.1624-1629, 2006.

OLIVEIRA, *et al.* Farelo de arroz como substrato para a produção de lipases microbianas. *Revista de Agronomia e Medicina Veterinária IDEAU. Getúlio Vargas*, v. 01, n. 02, 2014.

OLIVEIRA, B. H. Imobilização e caracterização parcial de lipase produzida por *Fusarium oxysporum* em fermentação submersa. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2012 .

OLIVEIRA, *et al.* Análise da produção de exoenzimas: amilase, pectinase, lactase e xilanase por bactérias isoladas dos frutos da Macaúba (*Acrocomia aculeata*). In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012. Anais do XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012.

ORLANELLI, R. C.; FELBER, A.C. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. P97-109, 2012.

ORGENSEN, H. AND OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888: Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzymes and Microbial Technology*, v.38. p.381-390, 2006

PANDEY A., *et al.* Solid State Fermentation in Biotechnonlogy – Fundamentals & Applications 1st ed. New Delhi, Asiatech Publishers Inc., 2001.

PANDEY, A., *et al.* Enzyme Technology. 1º ed. New Delhi, Asiatech Publishers, p. 760, 2005.

PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. Química nova, vol. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PARIS, *et al.* Produção de complexos enzimáticos por *A. niger* a partir de soja por fermentação em estado sólido. Acta Scientiarum Technology, v. 34, n. 2, p. 193-200, 2012.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R. da; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. Ciências e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 23, n. 2, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612003000200006&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 11 Mar. 2015.

PEREIRA, José Henrique Bernardes. Valor nutritivo da Torta da Polpa da Macaúba (*Acrocomia aculeata*) para suínos em crescimento. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2013.

PATEL, R. N. Microbial/ enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. Enzyme and Microbial Technology, Atlanta, v. 31, n. 6, p. 804-826, 2002.

PATIL, *et al.* Extracellular Enzymatic Activities of Endophytic Fungi Isolated from Various Medicinal Plants. International Journal of Current Microbiology and Applied, v. 4, n.3, p. 1035-1042, 2015.

PICART, P.; DIAZ, P. E PASTOR, F. I. J. Cellulases from two *Penicillium* sp. strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. Letters in Applied Microbiology. v. 45,p. 108–113, 2007.

PIMENTA, T. V. Metodologias de Obtenção e Caracterização dos Óleos do fruto da Macaúba com Qualidade alimentícia: da Coleta à Utilização. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

PIMENTEL, M. C. B. Produção de lipases por fungos filamentosos: estudos cinéticos e síntese de esteres. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas . Instituto de Química. Campinas, SP. 1996

PINTO, G. A. S. Produção de tanase por *Aspergillus niger*. Tese (Doutorado) Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

PIZARRO, A. V. L.; PARK, E. Y. Lipase catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 7, p. 1077-1082, 2003.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHIMID, R.D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.93, p.67–80, 1998.

POLITZER, K.; BON, E. P. S. *Enzimas Industriais e Especiais*. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ciência, Tecnologia e Inovação, Rio de Janeiro, 2006

POUDEROYEN, G, *et al.* The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal a/b Hydrolase Fold Enzyme. *Journal of Molecular Biology*, v.309, p. 215 - 226, 2001.

PROZYN INDÚSTRIA E COMÉRCIO. *Enzimas Catalizadoras de Reações Biológicas. Funcionais & Nutracêuticos*. São Paulo, 2012; Disponível em: http://www.insumos.com.br/funcionais_e_nutraceuticos/materias/86.pdf. Acesso em: 29 de set. de 2014.

QURESHI, A.S., BHUTTO, M. A., KHUSHK, I., DAHOT M.U. Optimization of cultural conditions for protease production by *Bacillus subtilis* EFRL. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 5173-5181, 2011.

RAMACHANDRAN, S., *et al.* Alpha Amylase from a Fungal Culture Grown on Oil Cakes and Its Properties. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 47, n 02, p. 309-312, 2009.

RAMANATHAN, G; BANUPRIYAAND, S. e ABIRAMI, D. Production and optimization of cellulase from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation. *Journal of Scientific & Industrial Research*. v. 69, p. 454-459, 2010.

RAO, M. B., *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

REIS, P. *et al.* Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, v.147-148, p.237-250, 2009.

REIS, L. Produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica. Dissertação (Mestrado). Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.

REOLON, C. A., *et al.* Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo em diferentes estagio de maturação. *Curitiba*, v. 27, n. 2, p. 305-312, 2009.

RESENDE, A. A. Leveduras associadas a frutos da Macaúba (*Acrocomia aculeata* Jaq. Lodd. Ex Mart): diversidade e caracterização quanto à produção de exoenzimas e fatores de crescimento. Dissertação (mestrado). Programa de Pós Graduação em Microbiologia do

Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2014.

RETTORE, R.P.; MARTINS, H. Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais: Estudo das oleaginosas nativas de Minas Gerais. Projeto da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, Belo Horizonte, vol. 1, 1983.

REZENDE, *et al.* Quality of silage from sugar cane and elephant grass supplemented with pie coconut Macaúba pulp Adauton. *Revista Agrarian*, Dourado, v.3, n.9, p.224-232, 2010.

RIOU, C., *et al.* Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant β -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p.3607, 1998.

RITTER, C. E. T. *et al.* Cellulase and Xylanase Production by *Penicillium echinulatum* in Submerged Media Containing Cellulose Amended with Sorbitol. *Enzyme Research*, 2013.

RODRIGUES, R. C. Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual. Tese (Doutorado), 2009.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.30, n.1, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612010000100019&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 03 Nov. 2014.

RUEGGER, M. J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Rev. bras. Bot.*, São Paulo, v. 27, n. 2, Junho 2004. Disponível em :<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042004000200001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 03 Nov. 2014.

RUFINO, L.M.A.; BARRETO, S.M.P.; DUARTE, E.R. Efeitos da inclusão de torta de Macaúba sobre a população de protozoários ruminais de caprinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, p.899-903, 2011.

RYU, D. Y.; MANDELS, M. Cellulases: Biosynthesis and applications. *Enzyme Microbiology Technology*, 1980.

SAIMA, S.; RIYAZ-UL-HASSAN, S; JOHRI, S. A Novel Cellulase from an Endophyte, *Penicillium* Sp. NFCCI 2862. *American Journal of Microbiological Research*, v. 1, n.4 p. 84-91, 2013.

SANTOS FILHO, J. dos. Estudo da gaseificação da torta do coco Macaúba, lenha de eucalipto, lenha de café e do carvão vegetal e seu potencial energético para desidratação de frutas. Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2009.

SANTOS, H.T. L. Avaliação da torta de Macaúba como insumo para produção de bioetanol. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2011.

SANTOS, R. S. dos. Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por fungos filamentosos utilizando resíduos da cadeia do biodiesel como fonte de carbono. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências Exatas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2013.

SCHNEIDER, W.D.H et al. Efeito da temperatura na produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* XVIII Encontro de Jovens Pesquisadores - Universidade de Caxias do Sul, 2010.

SCHRAG JD, CYGLER M: Lipases and α/β hydrolase fold. *Methods Enzymology*, v.284, p. 85-107, 1997.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Guaíba: Agropecuária, p.463, 2001.

SHAFIQUE, S. et al. Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extra cellular alpha-amylase activity. *Pakistan Journal of Botany*, v.41, p.897-905, 2009.

SHAH, K.K., PATEL, P.M., AND BHATT, S.A., Lipase production by *Bacillus* sp. under different physico-chemical conditions, *Journal of Microbiology*, v. 47, n.5, p. 563-571, 2007.

SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v.19 n.8, p.627-662, 2001.

SHIN, C. *et al.* Enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 on various lignocellulosic substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.237, p.84-86, 2000.

SILVA, *et al.* Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 321-326, 2005.

SILVA, G. A. B., *et al.* Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 3, n. 1, p. 28-41, 2009.

SILVA, I.D *et al.* Extração combinada do óleo de Macaúba: tecnologia enzimática e prensagem hidráulica. In: Congresso Brasileiro de Plantas Oleoginasas, Lavras. 2008. Anais... Lavras: 2008.

SILVA, I. F. Produção de amilases por *Bacillus amyloliquefaciens* utilizando torta de Macaúba (*Acrocomia aculeata*) e farinha de pupunha (*Bactris gasipaes*) como substratos. Orientador: Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos. Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzela. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em

Química) – Faculdade de Ciências Exatas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2012.

SILVA, J.S. de O. Efeito de reguladores na maturação e manejo pós-colheita *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.ex Mart. 2011. Tese (Doutorado). Programa de Pós Graduação em Fitotecnia. Viçosa-MG, 2011.

SILVA, L.A.O. ; PAIVA, F. C. ; NOGUEIRA, V.B. . Resíduo de castanha (*Bertholletia excelsa*) como substrato na fermentação sólida para produção de Proteases e Beta-glucosidase. In 3º Simpósio Iberoamericano de Ingeniería de Resíduos/2º Seminário da Região Nordeste sobre Resíduos Sólidos, João Pessoa, Paraíba, 2010.

SILVA, M.R.O., *et al.* Estudo de métodos de extração de protease termoestável produzida pelo *Penicillium aurantiogriseum*. In: Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003.

SILVA , N. A.; LINS, C. E. L. Fungos filamentosos em solo de caatinga: diversidade e atividade enzimática In: XVI CONIC - Congresso de Iniciação Científica da UFPE, 2008.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microbiology Technology*. 46: 541-549, 2010.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, v.166, n. 2, p.486–520, 2012.

SINGH, A.; HAYASHI, K. Microbial cellulases: Protein architecture, molecular properties, and biosynthesis. *Advances in Applied Microbiology*, San Diego, v. 40, p. 1-44, 1995.

SINGH, A.; SINGH, N. e BISHNOI, N. R. Production of Cellulases by *Aspergillus Heteromorphus* from Wheat Straw under Submerged Fermentation. *International Journal of Civil and Environmental Engineering*, v. 1, n.1, p. 23-26, 2009

SINGHANIA, R. R. *et al.* Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SOBHA, K. *et al.* Evaluation of Lipase Production from *A. Japonicus* Using Various Vegetable Oil Substrates and Physico-Chemical Factors Affecting Lipase Activity by Response Surface Methodology. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, v. 3, n. 6, 2014.

SOHAIL, M., *et al.* Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *New Biotechnology*, 2009.

SOUZA, L. A., *et al.* Lipolytic Potential of *Aspergillus japonicus* LAB01: Production, Partial Purification, and Characterisation of an Extracellular Lipase. *BioMed Research International*, v. 2014, 2014.

STERNBERG, D.; DORVAL, S. Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 1979.

SUKUMARAN, R.; SINGHANIA, R.; PANDEY, A. Microbial cellulases - production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v. 64, n. 11, p. 832-844, 2005.

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

SZPIZ, R. R.; *et al.* Óleos de Macaúba: uma alternativa para a oleoquímica. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, p.1-10, 1989.

TAN, T.; ZHANG, M. X. e ZHANG, J. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1495-1502, 2004.

TAPPI TECHNICAL DIVISIONS AND COMMITTEES. Tappi standart methods. TAPPI, Atlanta, 1993.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY – TAPPI. In: TAPPI Standard Methods. Atlanta, USA. Tappi Press. Cd-Rom, 2001.

TEOTIA, S.; KHARE, S. K.; GUPTA, M. N. An efficient purification process for sweet potato beta-amylase by affinity precipitation with alginate. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, n. 9-10, p. 792-795, 2001.

THYS, R. *et al.* Characterization of a protease of a feather-degrading Microbacterium species. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 39, n. 2, p. 181-186, 2004.

TILAHUN, W. W., *et al.* Pós-colheita de frutos de Macaúba em ambiente com temperatura controlado: efeito sobre a água na polpa. Artigo publicado nos anais do Congresso Brasileiro de Macaúba, em 2013.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. 2009.

TUOMELA, M.; *et al.* Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, v. 72, p.169 -183, 2000.

TURATI, D. F. M. Influência de parâmetros nutricionais e físicos sobre a produção de lipase por *Penicillium janthinellum*. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2012.

VARGAS G.D.L, *et al.* Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.83, p.47-54, 2008.

VARGAS, L. H. M., *et al.* Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 20, n. 2, p. 137-142, 2004.

VAN TILBEURGH, H.; CLAEYSSSENS, M. Detection and differentiation of cellulase components using low molecular mass fluorogenic substrates. *Febs Letters* v.187, n.2, p.283-288, 1985.

VÉLEZ ESCALLÓN, A. M. Estudo da expressão de lipase BTL2 de *Bacillus thermocatenuatus* em *E. coli* recombinante. Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

VEREDIANO, F. C. Aproveitamento da torta residual da extração do óleo da Polpa de Macaúba para fins alimentícios. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

VILLAVARDE A., *et al.* Fine regulation of cI857- controlled gene expression in continuous culture of recombinant *Escherichia coli* by temperature. *Applied and environmental microbiology*. v.59, p.3485-3487, 1993.

WALLIS, A., WEARNE, R. WRIGHT, P., Chemical Analysis of polysaccharides in plantation eucalypt woods and pulps. *Appita Journal*, v.49, n. 1, p. 258-262, 1996.

WANG, Q., *et al.* Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v. 43, p.280–286, 2008.

WATANABE, H.e TOKUDA, G. Cellulolytic systems in insects. *Annual Review of Entomology*, v. 55, p. 609-632, 2010.

WILSON, D. Cellulases and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, n. 3, p. 295-299, 2009.

WINKLER, U.K; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, v.138, p. 663–670, 1979.

WISEMAN, A. Manual de biotecnologia de las enzimas . Espanha, Zaragoza: Acribia, p. 444, 1991.

WUBBOLTS, M.G.; BUCKE, C.; BIELEKI, S. How to get the biocatalyst. In: Applied Biocatalysis. Ed Straathof, A.J.J, Adlercreutz. P. Academic Publishers Amsterdam, p. 153-211, 2000.

XIAO Z, STORMS R, TSANG, A. Microplate-based assay to measure total cellulase activity. Bioengineering and Biotechnology, v. 88, p.832-837, 2004.

YANG, X., *et al.* Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. Process Biochemistry, v. 40, n. 6, p. 2095–2103, 2005.

YUN, S. I., *et al.* Purification and some properties of a beta-glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v.65, p.2028, 2001.

ZAKIPOUR, R. E.; DAD, S. Effects of frying by different frying oils on fatty acid profile of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Iranian Journal of Fisheries Sciences, p. 704-712, 2012.

ZAKPAA, H. D.; MAK-MENSAH, E. E.; JOHNSON, F. S. Saccharification of maize agrowastes by cellulolytic fungi isolated from ejura farms em Ejura, Gana. Journal of Science and Technology, v. 30, n. 1, p 10-17, 2010.

ZAREVÚCKA, M.; *et al.* Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. Enzyme and Microbial Technology, v. 37, p. 481-486, 2005.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. Biotechnology Advances, v. 24, n.5, p. 452-481, 2006.

ZHOU *et al.* Solid-state fermentation of *Ginkgo biloba* L. residue for optimal production of cellulase, protease and the simultaneous detoxification of *Ginkgo biloba* L. residue using *Candida tropicalis* and *Aspergillus oryzae*. European Food Research and Technology, v .240, n.2, p 379-388, 2015.

8 ANEXO

Anexo 1: Análise de variância para Lipase UmL⁻¹ no ensaio de fermentação de *Penicillium* sp. M89 em meio contento torta de Macaúba segundo delineamento fracionado de níveis mistos.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
pH	1	0,03405	0,034052	2,63	0,115
Temperatura	1	0,05099	0,050994	3,94	0,057
Fonte de Carbono	1	0,10935	0,109354	8,46	0,007
% da Fonte de Nitrogenio	1	0,02599	0,025986	2,01	0,167
Fonte de Nitrogênio	2	0,28280	0,141398	10,94	0,000
Erro	29	0,37497	0,012930		
Falta de ajuste	5	0,28241	0,056482	14,64	0,000
Erro puro	24	0,09256	0,003857	*	*
Total	35	0,85509			

Sumário do Modelo

S	R2	R2 (aj)	R2 (pred)
0,113711	56,15%	47,08%	30,96%

Coefficientes

Termo	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,1048	0,0190	5,53	0,000	
pH					
1	0,0308	0,0190	1,62	0,115	1,00
2	-0,0308	0,0190	-1,62	0,115	*
Temperatura					
1	0,0376	0,0190	1,99	0,057	1,00
2	-0,0376	0,0190	-1,99	0,057	*
Fonte de Carbono					
1	-0,0585	0,0201	-2,91	0,007	1,13
2	0,0585	0,0201	2,91	0,007	*
% da Fonte de Nitrogenio					
1	-0,0285	0,0201	-1,42	0,167	1,13
2	0,0285	0,0201	1,42	0,167	*
Fonte de Nitrogênio					
a	-0,0469	0,0268	-1,75	0,091	1,33
b	-0,0772	0,0268	-2,88	0,007	1,33
c	0,1241	0,0268	4,63	0,000	*

Anexo 2: Análise de variância para Celulase UmL⁻¹ no ensaio de fermentação de *Penicillium* sp. M89 em meio contento torta de Macaúba segundo delineamento fracionado de níveis mistos.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
pH	1	0,000146	0,000146	2,64	0,115
Temperatura	1	0,000593	0,000593	10,70	0,003
Fonte de Carbono	1	0,000186	0,000186	3,35	0,078
% da Fonte de Nitrogenio	1	0,000124	0,000124	2,24	0,145
Fonte de Nitrogênio	2	0,000295	0,000147	2,66	0,087
Erro	29	0,001608	0,000055		
Falta de ajuste	5	0,000762	0,000152	4,32	0,006
Erro puro	24	0,000846	0,000035	*	*
Total	35	0,002877			

Sumário do Modelo

S	R2	R2 (aj)	R2 (pred)
0,0074471	44,10%	32,53%	14,93%

Coeficientes					
Termo	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante	0,01937	0,00124	15,61	0,000	
pH					
1	0,00202	0,00124	1,62	0,115	1,00
2	-0,00202	0,00124	-1,62	0,115	*
Temperatura					
1	0,00406	0,00124	3,27	0,003	1,00
2	-0,00406	0,00124	-3,27	0,003	*
Fonte de Carbono					
1	-0,00241	0,00132	-1,83	0,078	1,13
2	0,00241	0,00132	1,83	0,078	*
% da Fonte de Nitrogenio					
1	-0,00197	0,00132	-1,50	0,145	1,13
2	0,00197	0,00132	1,50	0,145	*
Fonte de Nitrogênio					
a	0,00294	0,00176	1,68	0,105	1,33
b	-0,00388	0,00176	-2,21	0,035	1,33
c	0,00094	0,00176	0,53	0,598	*

Anexo 3: Análise de variância para lipaseUmL⁻¹ no ensaio de fermentação de *Penicillium* sp. M89 em meio contento torta de Macaúba segundo DCCR.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	0,60675	0,121349	2,75	0,035
Linear	2	0,30976	0,154878	3,51	0,041
% fonte de carbono	1	0,19789	0,197895	4,49	0,042
Temperatura	1	0,11186	0,111860	2,54	0,121
Quadrado	2	0,00691	0,003456	0,08	0,925
% fonte de carbono*% fonte de carbono	1	0,00642	0,006420	0,15	0,705
Temperatura*Temperatura	1	0,00013	0,000134	0,00	0,956
Interação com 2 Fatores	1	0,29008	0,290078	6,58	0,015
% fonte de carbono*Temperatura	1	0,29008	0,290078	6,58	0,015
Erro	33	1,45487	0,044087		
Falta de ajuste	3	0,71074	0,236915	9,55	0,000
Erro puro	30	0,74412	0,024804	*	*
Total	38	2,06162			

Sumário do Modelo				
S	R2	R2 (aj)	R2 (pred)	
0,209969	29,43%	18,74%	2,10%	

Coeficientes Codificados						
Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante		0,1473	0,0542	2,72	0,010	
% fonte de carbono	-0,1816	-0,0908	0,0429	-2,12	0,042	1,00
Temperatura	0,1365	0,0683	0,0429	1,59	0,121	1,00
% fonte de carbono*% fonte de carbono	-0,0351	-0,0175	0,0460	-0,38	0,705	1,02
Temperatura*Temperatura	0,0051	0,0025	0,0460	0,06	0,956	1,02
% fonte de carbono*Temperatura	-0,3110	-0,1555	0,0606	-2,57	0,015	1,00

Anexo 4: Análise de variância para lipase Umg⁻¹ de proteína no ensaio de fermentação de *Penicillium* sp. M89 em meio contento torta de Macaúba segundo DCCR.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	458,95	91,790	3,19	0,019
Linear	2	238,66	119,329	4,15	0,025
% fonte de carbono	1	145,06	145,062	5,04	0,032
Temperatura	1	93,60	93,597	3,25	0,080
Quadrado	2	1,80	0,898	0,03	0,969
% fonte de carbono*% fonte de carbono	1	1,29	1,287	0,04	0,834
Temperatura*Temperatura	1	0,31	0,313	0,01	0,918
Interação com 2 Fatores	1	218,50	218,496	7,59	0,009
% fonte de carbono*Temperatura	1	218,50	218,496	7,59	0,009

Erro	33	949,45	28,771			
Falta de ajuste	3	494,64	164,879	10,88	0,000	
Erro puro	30	454,81	15,160	*	*	
Total	38	1408,40				

Sumário do Modelo

S	R2	R2 (aj)	R2 (pred)
5,36388	32,59%	22,37%	3,96%

Coefficientes Codificados

Termo	Efeito	EP de		Valor T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
Constante	3,48	1,38	2,51		0,017	
% fonte de carbono	-4,92	-2,46	1,09	-2,25	0,032	1,00
Temperatura	3,95	1,97	1,09	1,80	0,080	1,00
% fonte de carbono*% fonte de carbono	-0,50	-0,25	1,17	-0,21	0,834	1,02
Temperatura*Temperatura	0,24	0,12	1,17	0,10	0,918	1,02
% fonte de carbono*Temperatura	-8,53	-4,27	1,55	-2,76	0,009	1,00

Anexo 5: Análise de variância para lipase Ug⁻¹ de biomassa no ensaio de fermentação de *Penicillium* sp. M89 em meio contendo torta de Macaúba segundo DCCR.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	6112,6	1222,52	4,41	0,003
Linear	2	2505,3	1252,63	4,51	0,018
% fonte de carbono	1	1861,5	1861,46	6,71	0,014
Temperatura	1	643,8	643,81	2,32	0,137
Quadrado	2	688,8	344,39	1,24	0,302
% fonte de carbono*% fonte de carbono	1	5,2	5,16	0,02	0,892
Temperatura*Temperatura	1	687,4	687,44	2,48	0,125
Interação com 2 Fatores	1	2918,5	2918,53	10,52	0,003
% fonte de carbono*Temperatura	1	2918,5	2918,53	10,52	0,003
Erro	33	9157,1	277,49		
Falta de ajuste	3	7465,6	2488,52	44,13	0,000
Erro puro	30	1691,6	56,39	*	*
Total	38	15269,7			

Sumário do Modelo

S	R2	R2 (aj)	R2 (pred)
16,6580	40,03%	30,94%	7,32%

Coefficientes Codificados

Termo	Efeito	EP de		Valor T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
Constante	8,23	4,30	1,91		0,064	
% fonte de carbono	-17,61	-8,81	3,40	-2,59	0,014	1,00
Temperatura	10,36	5,18	3,40	1,52	0,137	1,00
% fonte de carbono*% fonte de carbono	0,99	0,50	3,65	0,14	0,892	1,02
Temperatura*Temperatura	11,48	5,74	3,65	1,57	0,125	1,02
% fonte de carbono*Temperatura	-31,19	-15,60	4,81	-3,24	0,003	1,00

Anexo 6: Análise de variância para celulase UmL⁻¹ no ensaio de fermentação de *Penicillium* sp. M89 em meio contendo torta de Macaúba segundo DCCR.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	0,006519	0,001304	4,65	0,003
Linear	2	0,000977	0,000488	1,74	0,191
% fonte de carbono	1	0,000445	0,000445	1,59	0,217
Temperatura	1	0,000532	0,000532	1,90	0,178
Quadrado	2	0,005521	0,002761	9,84	0,000

% fonte de carbono*% fonte de carbono	1	0,000182	0,000182	0,65	0,427
Temperatura*Temperatura	1	0,005507	0,005507	19,64	0,000
Interação com 2 Fatores	1	0,000021	0,000021	0,07	0,786
% fonte de carbono*Temperatura	1	0,000021	0,000021	0,07	0,786
Erro	33	0,009255	0,000280		
Falta de ajuste	3	0,003443	0,001148	5,93	0,003
Erro puro	30	0,005811	0,000194	*	*
Total	38	0,015774			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,0167463	41,33%	32,44%	17,31%

Coefficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante		0,06415	0,00432	14,84	0,000	
% fonte de carbono	0,00861	0,00431	0,00342	1,26	0,217	1,00
Temperatura	-0,00942	-0,00471	0,00342	-1,38	0,178	1,00
% fonte de carbono*% fonte de carbono	-0,00590	-0,00295	0,00367	-0,80	0,427	1,02
Temperatura*Temperatura	-0,03249	-0,01624	0,00367	-4,43	0,000	1,02
% fonte de carbono*Temperatura	0,00264	0,00132	0,00483	0,27	0,786	1,00

Anexo 7: Análise de variância para celulase Umg⁻¹ de proteína no ensaio de fermentação de *Penicillium* sp. M89 em meio contendo torta de Macaúba segundo DCCR.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	4,73120	0,94624	6,21	0,000
Linear	2	0,36459	0,18230	1,20	0,315
% fonte de carbono	1	0,06023	0,06023	0,40	0,534
Temperatura	1	0,30436	0,30436	2,00	0,167
Quadrado	2	4,36415	2,18208	14,32	0,000
% fonte de carbono*% fonte de carbono	1	0,08208	0,08208	0,54	0,468
Temperatura*Temperatura	1	4,36395	4,36395	28,63	0,000
Interação com 2 Fatores	1	0,00245	0,00245	0,02	0,900
% fonte de carbono*Temperatura	1	0,00245	0,00245	0,02	0,900
Erro	33	5,02962	0,15241		
Falta de ajuste	3	1,94305	0,64768	6,30	0,002
Erro puro	30	3,08657	0,10289	*	*
Total	38	9,76082			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,390401	48,47%	40,66%	25,86%

Coefficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor-P	VIF
Constante		1,557	0,101	15,45	0,000	
% fonte de carbono	0,1002	0,0501	0,0797	0,63	0,534	1,00
Temperatura	-0,2252	-0,1126	0,0797	-1,41	0,167	1,00
% fonte de carbono*% fonte de carbono	-0,1254	-0,0627	0,0855	-0,73	0,468	1,02
Temperatura*Temperatura	-0,9146	-0,4573	0,0855	-5,35	0,000	1,02
% fonte de carbono*Temperatura	-0,029	-0,014	0,113	-0,13	0,900	1,00

Anexo 8: Análise de variância para celulase Ug⁻¹ de biomassa no ensaio de fermentação de *Penicillium* sp. M89 em meio contendo torta de Macaúba segundo DCCR.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	636,47	127,293	7,42	0,000

Linear	2	365,99	182,997	10,67	0,000
% fonte de carbono	1	17,38	17,384	1,01	0,321
Temperatura	1	348,61	348,610	20,33	0,000
Quadrado	2	270,02	135,012	7,87	0,002
% fonte de carbono*% fonte de carbono	1	11,46	11,462	0,67	0,420
Temperatura*Temperatura	1	240,28	240,277	14,01	0,001
Interação com 2 Fatores	1	0,45	0,450	0,03	0,872
% fonte de carbono*Temperatura	1	0,45	0,450	0,03	0,872
Erro	33	566,01	17,152		
Falta de ajuste	3	382,47	127,489	20,84	0,000
Erro puro	30	183,54	6,118	*	*
Total	38	1202,47			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
4,14146	52,93%	45,80%	27,97%

Coefficientes Codificados

Termo	Efeito	EP de		Valor T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
Constante		4,46	1,07	4,17	0,000	
% fonte de carbono	-1,702	-0,851	0,845	-1,01	0,321	1,00
Temperatura	7,622	3,811	0,845	4,51	0,000	1,00
% fonte de carbono*% fonte de carbono	-1,482	-0,741	0,907	-0,82	0,420	1,02
Temperatura*Temperatura	6,786	3,393	0,907	3,74	0,001	1,02
% fonte de carbono*Temperatura	0,39	0,19	1,20	0,16	0,872	1,00

Anexo 9: Análise de variância para celulase Ug⁻¹ de biomassa no ensaio de fermentação de *Penicillium* sp. M89 em meio contendo torta de Macaúba segundo DCCR.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	1351369	270274	10,43	0,000
Linear	2	788992	394496	15,23	0,000
% fonte de carbono	1	457271	457271	17,65	0,000
Temperatura	1	331721	331721	12,80	0,001
Quadrado	2	423630	211815	8,18	0,001
% fonte de carbono*% fonte de carbono	1	52848	52848	2,04	0,163
Temperatura*Temperatura	1	329167	329167	12,70	0,001
Interação com 2 Fatores	1	138748	138748	5,36	0,027
% fonte de carbono*Temperatura	1	138748	138748	5,36	0,027
Erro	33	855007	25909		
Falta de ajuste	3	367176	122392	7,53	0,001
Erro puro	30	487831	16261	*	*
Total	38	2206376			

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
160,964	61,25%	55,38%	47,13%

Coefficientes Codificados

Termo	Efeito	EP de		Valor T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
Constante		412,4	41,6	9,92	0,000	
% fonte de carbono	-276,1	-138,0	32,9	-4,20	0,000	1,00
Temperatura	-235,1	-117,6	32,9	-3,58	0,001	1,00
% fonte de carbono*% fonte de carbono	100,6	50,3	35,2	1,43	0,163	1,02
Temperatura*Temperatura	-251,2	-125,6	35,2	-3,56	0,001	1,02
% fonte de carbono*Temperatura	215,1	107,5	46,5	2,31	0,027	1,00

