

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DE *Aspergillus brasiliensis* EM BAGAÇO DE MALTE  
PARA PRODUÇÃO DE LIPASES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PAULO EICHLER

PORTO ALEGRE - RS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DE *Aspergillus brasiliensis* EM BAGAÇO DE MALTE  
PARA PRODUÇÃO DE LIPASES**

PAULO EICHLER

Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia

Dissertação de mestrado submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Química da UFRGS como requisito para a  
obtenção do grau de Mestre em Engenharia  
Química

Orientador:

**Prof. PhD. Marco Antônio Záchia Ayub**

Co-orientador:

**Prof. Dr. Fernando Almeida Santos**

PORTO ALEGRE - RS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a defesa de Dissertação de Mestrado, cujo projeto intitula-se “*Cultivo em estado sólido de Aspergillus brasiliensis em bagaço de malte para produção de lipases*”, elaborado por Paulo Eichler, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilian Raquel Hickert

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Manuela Polleto Klein

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariliz Gutterres Soares

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família, tanto os que moram perto quanto os que moram longe, por todo suporte e ajuda nos momentos de dificuldade, pelas orientações e dicas nos momentos de dúvidas e pelos sorrisos nos momentos de alegria. Em especial, meus pais Walter Eichler e Virginia Heberle Eichler, sempre incentivando a busca por conhecimento, dedicação e responsabilidade.

Também agradeço a todos os amigos pelas horas de descontração, conversas e ajuda, tornando realidade o sonho da minha especialização no mestrado “A felicidade é verdadeira apenas quando compartilhada”.

Agradeço à minha esposa Sheila Lais Miranda, pela atenção, carinho, compreensão, amor e apoio. Que possamos compartilhar todas nossas conquistas juntos.

Agradeço, em especial, ao professor Dr. Marco Ayub, que possibilitou que esse trabalho se tornasse possível, sempre disponibilizando seu tempo e recursos para isso. Obrigado por acreditar em mim e no meu trabalho!

Também agradeço ao meu co-orientador Dr Fernando Santos, pela orientação tanto dentro da academia quanto fora dela, me inspirando a não desistir dos meus sonhos. Obrigado pela inspiração, confiança e incentivo.

Agradeço ao grupo de pesquisa do Bioteclab, pelas amizades, pela dedicação nos trabalhos acadêmicos, companheirismo e pelos momentos de descontração. Com certeza o trabalho é feito com ajuda de todos.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos funcionários, demais professores e colegas da UFRGS pelo empenho e dedicação à universidade, mostrando sempre alto grau de profissionalismo.

Por fim, dedico este trabalho ao meu sobrinho, Rafael, que representa o futuro da humanidade e me motiva a trabalhar por um mundo melhor.

## RESUMO

Tendo em vista a atual crise energética e anseios por novas tecnologias de produção de biocombustíveis de forma sustentável, estudos de eficiência de produção de biocatalisadores têm se mostrado mais frequentes. Biocatalisadores como lipases, usadas na produção de biodiesel, têm alta eficiência de conversão, pouca formação de subprodutos, operação em condições mais amenas e podem ser produzidos de forma sustentável. A produção de lipases no cultivo em estado sólido é bem estudada por apresentar vantagens econômicas em aplicações industriais, como tratamento de efluentes e produção de biodiesel. O bagaço de malte é o principal subproduto da indústria de cervejaria, que representa cerca de 85 % do total de resíduos neste setor industrial, tendo excelentes perspectivas para os processos de biorrefinaria por seu baixo custo e presença de açúcares fermentescíveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar condições ideais de produção de lipase por *Aspergillus brasiliensis* cultivado em estado sólido sobre bagaço de malte usando planejamento experimental e, após, realizar cultivos em biorreator cilíndrico com passagem forçada de ar e biorreator de tambor agitado em escala piloto com condições otimizadas para avaliar melhores cenários de produção de lipase para aplicações industriais. A produção de lipase por cultivo em estado sólido foi otimizada usando análise do Delineamento Composto Central, metodologia de superfície de resposta e validada, com parâmetros ótimos obtidos de pH de 7,71, 11,34 % de óleo de soja a 32,74 °C, apresentando atividade máxima, em 96 h, para esse cultivo de 8,17 U.g<sup>-1</sup>. As condições ótimas obtidas na análise estatística foram utilizadas para produzir lipase em diferentes tipos de biorreatores de estado sólido, obtendo resultados de produção maiores em biorreator com leito fixo e aeração forçada, com 9,83 U.g<sup>-1</sup> de atividade de lipase. Além disso, foi utilizado o bagaço de malte fermentado liofilizado, chamado de Preparado Enzimático Sólido (PES), para avaliar a atividade da lipase e a conversão da reação de transesterificação. Resultados obtidos de atividade de lipase no fermentado sólido foi de 7,35 U.g<sup>-1</sup> de substrato, e obteve-se 2,15 % de conversão da transesterificação em 18 h de reação. Apesar de ser relativamente baixo o valor de conversão de ésteres etílicos, como a reação não foi otimizada, mais experimentos seriam necessários para avaliar a possibilidade de uso deste bagaço fermentado para produção de biodiesel. Apesar disso, valores de atividade de lipase no preparado enzimático foram relativamente parecidos com os valores encontrados nos extratos dos cultivos em bancada, mostrando ser possível o uso para finalidades como tratamento de efluentes oleosos ou biorremediação.

Palavras-chave: Lipase, Cultivo Estado Sólido, Bagaço de Malte, Preparado Enzimático Sólido.

### ABSTRACT

In view of current energy crisis, desire for new sustainable technologies for production of biofuels, biocatalysts efficiency studies appears more frequent. Biocatalysts such as lipases, used in production of biodiesel, have high conversion efficiency, less by-product formation, operation under milder conditions and can be produced in a sustainable way. The production of lipases in solid state cultivation is well studied because it presents economic advantages in industrial applications such as effluent treatment and biodiesel production. Malt bagasse is the main by-product of brewery industry, which accounts for about 85 % of total waste in this industrial sector, and has excellent prospects for biorefinery processes due to its low cost and presence of fermentable sugars. The objective of this work was to evaluate optimal conditions of lipase production by *Aspergillus brasiliensis*, grown in solid state cultivation of malt bagasse, using experimental design and, afterwards, perform cultivation in cylindrical bioreactor with forced aeration and pilot scale agitated drum bioreactor under optimal conditions to evaluate better scenarios of lipase production for industrial applications. The production of lipase in the solid state culture was optimized using Central Composite Design analysis and validated, with optimum parameters obtained as pH 7.71, 11.34 % of soybean oil at temperature of 32.74 °C, presenting maximum lipase activity at 96 h, with 8,17 U.g<sup>-1</sup>. In addition, the optimal conditions obtained in the statistical analysis were used to produce lipase in different types of solid state bioreactors, obtaining higher production results in bioreactor with fixed bed and forced aeration, with 9.83 U.g<sup>-1</sup> of lipase activity. Finally, a Solid Enzymatic Preparation (SEP) was used to evaluate lipase activity and conversion of transesterification reaction. Results obtained for lipase activity of the fermented solid was 7.35 U.g<sup>-1</sup>, and 2.15% transesterification conversion was achieved in 18 h of reaction. Although conversion value of ethyl esters was relatively low, but as the reaction was not optimized, more experiments would be necessary to evaluate the possibility of using this fermented solid for biodiesel production. Nevertheless, values of lipase activity in the enzymatic preparation were relatively similar with results found in the extracts of the bench scale cultures, showing that it is possible to use them for purposes such as treatment of oily effluents or bioremediation.

Keywords: Lipase, Solid State Cultivation, Malt Bagasse, Solid Enzymatic.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Configuração básica dos diferentes biorreatores para cultivo em estado sólido.....	22
Figura 2 – Representação da molécula de celulose. ....	25
Figura 3 – Representação da molécula de hemicelulose. ....	25
Figure 4 – Representação esquemática da lignina. ....	26
Figura 5 – Frascos de vidro cilíndricos usados como biorreatores em estado sólido.....	35
Figura 6 – Visões externa e interna do biorreator cilíndrico de tambor agitado. ....	36
Figure 7 – Perfis de atividade de lipase para os resultados dos tratamentos do DCC para os tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 h, onde (a) são os tratamentos A, B, C e D, (b) são os tratamentos E, F, G e H, (c) são os tratamentos I, J, K e L e (d) são os tratamentos M, N, O e P.....	41
Figure 8 - Perfis de pH para os resultados dos tratamentos do DCC para os tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 h, onde (a) são os tratamentos A, B, C e D, (b) são os tratamentos E, F, G e H, (c) são os tratamentos I, J, K e L e (d) são os tratamentos M, N, O e P. ....	42
Figura 9 – Superfícies de resposta obtidas a partir da análise do DCC em 96 h de cultivo para (a) influência da temperatura e % óleo, (b) influência da temperatura e pH e (c) influência do % óleo e pH na atividade de lipase.....	43
Figura 10 – Perfis de atividade lipolítica e pH do cultivo de validação do modelo estatístico. ....	46
Figura 11 - Perfil de atividade de lipase e pH para aumento de escala com biorreator com leito fixo e passagem de ar no leito. ....	48
Figura 12 – Perfil de atividade de lipase e pH durante teste em escala piloto. ....	49
Figura 13 - Perfis para (a) proteínas solúveis e açúcares redutores e (b) atividade de celulase e protease para o cultivo de validação.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relatos de uso de PES para fins industriais.....	17
Tabela 2 – Variáveis analisadas com nível e (medida) do planejamento experimental.....	32
Tabela 3 – Caracterização do bagaço de malte.....	38
Tabela 4 - Caracterização química do bagaço de malte. ....	39
Tabela 5 – Condições e atividade de lipase para 96 h de cultivo do planejamento experimental DCC.....	40
Tabela 6 – Valores críticos e solução predita pela análise DCC.....	44
Tabela 7 – Resultados da ANOVA do DCC. ....	44

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

PES – Preparado Enzimático Sólido

CES – Cultivo em Estado Sólido

CG – Cromatógrafo Gasoso

DCC – Delineamento Composto Central

DNS – Dinitrosalisílico

TGA – Thermogravimetric Analysis (Análise Termogravimétrica)

SEP – Solid Enzymatic Preparation

CSm – Cultivo em Estado Submerso

## SUMÁRIO

Capítulo 1 - Introdução.....	12
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica .....	14
2.1    LIPASES.....	14
2.1.1    Produção de lipases por fungo <i>Aspergillus</i> .....	15
2.1.2    Características da lipase.....	16
2.1.3    Preparado enzimático sólido.....	16
2.2    CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO .....	18
2.2.1    Parâmetros que afetam o cultivo.....	19
2.2.2    Tipos de biorreatores para CES .....	21
2.3    BIORREFINARIA.....	22
2.3.1    Composição química de resíduos agroindustriais.....	24
2.3.2    Bagaço de malte: usos, disponibilidade e mercado .....	26
Capítulo 3 - Materiais e Métodos .....	28
3.1    MATERIAIS.....	28
3.2    MICROORGANISMO E SELEÇÃO.....	28
3.3    CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE .....	29
3.3.1    Análise de lipídios .....	29
3.3.2    Análise de umidade.....	29
3.3.3    Análise de açúcares redutores.....	29
3.3.4    Análise de proteínas totais .....	29
3.3.5    Análise de cinzas .....	30
3.3.6    Análise de composição química .....	30
3.4    CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO .....	30
3.4.1    Delineamento experimental .....	31

3.4.2	Ensaio de atividade lipolítica .....	33
3.4.3	Produção de lipase em biorreatores diversificados .....	34
3.4.3.1	<i>Produção de lipase em biorreator cilíndrico com Passagem Forçada de Ar</i> .....	34
3.4.3.2	<i>Produção de lipases em biorreator de tambor agitado em escala piloto</i> .....	35
3.5	PREPARADO ENZIMÁTICO SÓLIDO .....	36
3.6	TESTE DE REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO .....	36
Capítulo 4 - Resultados e Discussão .....		38
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE .....	38
4.1.1.	Caracterização química .....	39
4.2.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	40
4.2.1.	Validação .....	46
4.3.	PRODUÇÃO DE LIPASE EM BIORREADORES COM AERAÇÃO E BIORREADORES COM AGITAÇÃO .....	47
4.3.1.	Biorreatores com aeração forçada em leito fixo .....	47
4.3.2.	Biorreator de tambor agitado em escala piloto .....	48
4.4.	PREPARADO ENZIMÁTICO SÓLIDO .....	49
Capítulo 5 – Conclusões .....		51
Capítulo 6 – Perspectivas .....		52
Capítulo 7 – Apêndice .....		60

# Capítulo 1 – Introdução

As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos, produzindo ácidos graxos livres e glicerol. Eles também catalisam a hidrólise, esterificação e transesterificação de ácidos graxos. Devido a características da lipase como sua versatilidade, seletividade, condições de reação moderadas e susceptibilidade à imobilização, essas enzimas são extremamente interessantes do ponto de vista comercial. Atualmente, lipases são usadas em vários processos industriais, como a produção de alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, detergentes e biocombustíveis entre outros usos (CHOUDHURY; BHUNIA, 2015; GUPTA, 1993; TREICHEL et al., 2010).

O mercado mundial de enzimas em 2014 atingiu 4,2 bilhões de dólares, e deverá crescer, com taxa de crescimento anual composto de 7 %, entre 2015-2020. Com essa projeção, espera-se que o mercado de lipases atinja 590,5 milhões de dólares em 2020. Durante a última década, as lipases foram estudadas como biocatalisadores para a produção de biodiesel. Isto é devido a algumas vantagens de usar lipases para a produção de biodiesel, tais como: uso de óleos ácidos sem redução de produtividade, geração de glicerol puro, produção de biodiesel de melhor qualidade como resultado da baixa produção de subprodutos, possibilidade de uso etanol 95 % (v/v), condições de reação mais suave e sem a necessidade de neutralizar o produto (CHAUHAN; YENNAMALLI; GARLAPATI, 2016; DE CASTRO; DE CASTRO, 2012).

Atualmente, as lipases são produzidas a partir do cultivo de microrganismos, devido à alta produtividade atribuídas aos bioprocessos, tanto em cultivos submersos quanto cultivos em estado sólido (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). No entanto, o Cultivo em Estado Sólido (CES) é enfatizado devido a algumas características importantes como a possibilidade de usar resíduos agroindustriais, o processo ser realizado em ausência de água livre e por apresentar efeito tamponante, entre outros, reduzindo o custo da produção de enzimas (EDWINOLIVER et al., 2010; PANDEY, 2003; SINGHANIA et al., 2009). Estas vantagens são exploradas por completo quando o CES é realizado com fungo filamentoso, baseado na alta capacidade desses microrganismos de colonizar o substrato e produzir enzimas líticas (PANDEY, 2003; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

O bagaço de malte, também conhecido como grão gasto de malte, é um resíduo

agroindustrial e é o maior subproduto da indústria de fabricação de cerveja, representando cerca de 85 % do total de resíduos gerados. Estima-se que, para cada hectolitro de cerveja produzida, geram-se 20 kg de malte (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006; THIAGO; PEDRO; ELIANA, 2014). Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, atrás da China e dos EUA, com uma estimativa de 140 milhões de hectolitros produzidos em 2016, o que representa um potencial de 2,8 milhões de toneladas de bagaço de malte disponíveis para uso em processos de biorrefinaria por ano. Esta biomassa está disponível a baixo custo ou mesmo sem custo ao longo do ano (MARCUSO; MULLER, 2012; MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006).

Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar as condições otimizadas para a produção de lipases no cultivo de estado sólido de *Aspergillus brasiliensis* em bagaço de malte, agregando valor a este resíduo agroindustrial e testando produção em escala aumentada das condições otimizadas. Ao final, o Preparado Enzimático Sólido (PES) foi testado como biocatalisador em uma reação enzimática de transesterificação de óleo de soja, como estudo preliminar de aplicação do produto.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✓ Caracterizar o resíduo de bagaço de malte.
- ✓ Estabelecer as condições ótimas do CES em relação ao pH, percentual de óleo de soja e temperatura através de um planejamento experimental.
- ✓ Avaliar a produção de lipase em reator de leito fixo com aeração forçada usando as condições otimizadas obtidas da análise do planejamento experimental.
- ✓ Avaliar a produção de lipase em biorreator de tambor agitado em escala piloto nas mesmas condições ótimas estabelecidas na análise estatística.
- ✓ Obter um Preparado Enzimático Sólido, e avaliar sua aplicação como biocatalisador em reação enzimática de transesterificação e reação de hidrólise de ácidos graxos.

# Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

## 2.1 LIPASES

Estas enzimas catalisam a reação de hidrólise de triglicerídeos, produzindo ácidos graxos livres e glicerol, assim como reações de síntese como esterificação e transesterificação. Lipases são consideradas parte de um grupo extremamente importante, atuando em uma vasta gama de processos industriais, pois podem funcionar em meio aquoso e não aquoso. Uma das particularidades da lipase é que a reação que é catalisada ocorre na interface água-lipídio, não seguindo uma cinética convencional de Michaelis-Menten (GUNCHEVA; ZHIRYAKOVA, 2011). Lipases possuem um enorme potencial biotecnológico devido às suas características: não requerem co-fatores para reação, estabilidade em solventes orgânicos, alta enantio-seletividade e possuem alta estabilidade em temperaturas e pH extremos (GOPINATH et al., 2013; TREICHEL et al., 2010).

As lipases são amplamente encontradas na natureza, sendo produzidas por uma variedade grande de organismos unicelulares e multicelulares, como bactérias, fungos, leveduras, plantas e animais. Entre essas fontes, os microrganismos se encontram como preferidos para produção por ser fácil, seguro, por sua produção estável em bioprocessos, possibilidade de uso de técnicas de manipulação genética e uso de meios de cultivo baratos para produção. Diversos microrganismos já foram estudados quanto à sua produção de lipase, podendo citar como melhores produtores os microrganismos do gênero *Candida*, *Rhizopus* e *Pseudomonas*, que são usados para produção industrial (HASAN et al., 2010; RIBEIRO et al., 2011; SINGH et al., 2014).

Os microrganismos podem produzir lipases de forma intracelular e extracelular, de modo que, industrialmente a melhor opção é a produção de lipases extracelulares por apresentar processo de purificação mais simplificado, diminuindo custo operacional. No caso de lipases extracelulares, a enzima é recuperada a partir do caldo ou extrato do cultivo do microrganismo e em seguida passa por uma etapa de purificação. Todas lipases comerciais são extracelulares, onde as mais utilizadas são: Novozyme 435, Lipozyme RMIM e Lipozyme TL IM. Essas enzimas podem ser produzidas por microrganismos através de CES e CSM, sendo que nos últimos anos têm se intensificado estudos de produção de lipase por CES pelas vantagens oferecidas pela técnica como: baixo custo operacional, baixo custo de substrato, menor quantidade de resíduos e menor susceptibilidade à contaminação. Como a lipase

comercial ainda possui custo elevado para uso na indústria, a produção de baixo custo oferecido por CES pode ser uma alternativa para tornar a lipase economicamente mais viável para processos industriais (DUTRA; TERZI, 2008; RIBEIRO et al., 2011; ROBLES-MEDINA, A, GONZÁLEZ-MORENO, P.A., ESTEBAN-CERDÁN, L., MOLINA-GRIMA, 2009; SOCCOL et al., 2017).

De acordo com a “Grand View Research Inc.”, em 2015 o tamanho do mercado global de enzimas foi de 8,18 bilhões de dólares, e é esperado que cresça até 17,50 bilhões de dólares até 2024 (RESEARCH, 2016). Este crescimento é esperado principalmente por causa da crescente aplicação de enzimas em diversas aplicações como: detergentes, bebidas, alimentos e fármacos. Seguindo a tendência mundial, é esperado um crescimento no mercado de lipases, visto que a aplicação desta enzima em produtos tem aumentado nos últimos anos, seu custo de produção tem se reduzido e novas tecnologias estão surgindo para melhorar índices de produtividade. As lipases, atualmente estão sendo empregadas em diversos setores industriais como: Indústria de alimentos (laticínios, queijos, carnes, peixes e bebidas), indústria de detergente (detergentes com enzimas são mais eficientes e menos poluentes, fazendo produtos de melhor qualidade), indústria de biocombustíveis (principalmente a produção de biodiesel, que pode ser catalisado pelas lipases, sendo mais eficiente que a maioria dos catalisadores químicos) e indústria de papel (o uso de lipases melhora a qualidade do processo e reduz custos de processamento) (DAIHA; ANGELI; OLIVEIRA, 2015; GURUNG et al., 2013; MENONCIN et al., 2010; RESEARCH, 2016; TREICHEL et al., 2010).

### **2.1.1 Produção de lipases por fungo *Aspergillus***

A produção de lipases através de CES e CSm de fungos do gênero *Aspergillus* é amplamente reconhecido, com *A. niger* entre os produtores de lipases mais conhecido (FALONY et al., 2006). A maior parte dos trabalhos foca em produção de lipases extracelulares e, analisando essas pesquisas, notam-se ótimos resultados de produção de lipases através do cultivo de diferentes linhagens de *A. niger* em CES, já que o tipo de processo apresenta certas características que o fungo consegue aproveitar como ausência de água livre e meio de cultivo simples (resíduos de biomassa) (MAHADIK et al., 2002). O uso de CES também pode apresentar mudanças interessantes na estrutura da lipase produzida, onde relatos mostram que a lipase produzida por *Aspergillus niger* em CES apresentou melhores valores de estabilidade térmica, chegando a 69%, comparado com produção de

lipase em CSm (57%), testado em 60 °C (KAMINI; MALA; PUVANAKRISHNAN, 1998). São notáveis as características das lipases dos fungos do gênero *Aspergillus*, como estabilidade e tolerância a faixas amplas de pH e temperatura, que fazem desses microrganismos potenciais produtores modelos de lipases, onde trabalhos de otimização de produção de lipases são essenciais para tal finalidade (KAUSHIK et al., 2006).

### **2.1.2 Características da lipase**

A maioria das lipases tem quase a mesma estrutura tridimensional caracterizada como dobradura de  $\alpha/\beta$ -hidrolase que contém uma particularidade em seu mecanismo de ação: a existência de uma cadeia de polipeptídeo, conhecida como tampa. Esta peculiaridade é considerada o principal determinante molecular da atividade e seletividade da lipase. A tampa cobre o sítio ativo da lipase em ambiente aquoso, conseqüentemente, a enzima possui baixa atividade lipolítica em sua conformação fechada. A ativação ocorre quando a lipase se adsorve em uma interfase lipídica, favorecendo o deslocamento da tampa, tornando o sítio ativo livre e acessível aos seus substratos, promovendo o que é chamado de ativação interfacial. Existem algumas lipases que não apresentam ativação interfacial significativa, são lipases que tem alterações conformacionais de forma aberta a fechada com aumento de temperatura (BROCCA et al., 2003; GANJALIKHANY et al., 2012).

Dentre as diversas reações catalisadas pelas lipases, as reações de transesterificação, ou síntese de biodiesel, estão entre as mais interessantes do ponto de vista comercial. Dentre as diversas vantagens no uso desta enzima para produção de biodiesel, as principais são: especificidade pelo substrato, condições brandas de operação, não necessitam co-fatores, geração de sub-produtos é reduzida, glicerol produzido é mais puro, são estáveis em solventes orgânicos e permitem uso de matérias primas mais baratas. Apesar das qualidades a produção de biodiesel por lipases ainda apresenta algumas desvantagens como o alto custo deste biocatalisador e sua inativação quando sujeito à condições mais severas de operação (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

### **2.1.3 Preparado enzimático sólido**

Lipases comerciais, apesar de possuírem alta eficiência catalítica, apresentam alto custo, tornando alguns processos comercialmente inviáveis. Lipases imobilizadas, apesar de apresentarem algumas vantagens sobre lipases livres, ainda apresentam alto custo de produção. Uma alternativa de baixo custo é o uso de Preparado Enzimático Sólido (PES) para

reações catalíticas. O PES, ou também conhecido como sólido fermentado, é feito através de CES ou CSm de algum microrganismo e posterior tratamento do cultivo, para retirar a umidade, de forma a gerar um sólido, ou semi-sólido, com atividade enzimática. Esta tecnologia é um produto biotecnológico já aplicado em alguns casos como tratamento de efluentes e produto que tem sido relatado como sendo simples e fácil, com bons resultados, baixo custo de produção com atividade enzimática, em que um meio de cultivo é usado para fins catalíticos. Este bioproduto já vêm sendo testado para reações de conversão de biodiesel, obtendo, em alguns casos, resultados de conversão maiores que algumas enzimas comerciais. O substrato usado para o CES nestes casos pode ser um resíduo agro-industrial, reduzindo ainda mais o custo de produção de enzimas e aumentando o potencial da técnica para processos industriais (ROSA et al., 2006; TAN et al., 2010). A Tabela 1 apresenta o microrganismos, substratos e uso de alguns PES já reportados na literatura.

Tabela 1 – Relatos de uso de PES para fins industriais.

<b>Microrganismo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Uso</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Burkholderia cepacia</i>	Cana-de-açúcar e semente de girassol	Produção de biodiesel	95 % de conversão de biodiesel em 46h	(SALUM et al., 2010)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Cana-de-açúcar e semente de girassol	Produção de biodiesel	92 % de conversão de biodiesel em 31h	(SOARES et al., 2013)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Babassu	Produção de biodiesel	91 % de conversão de biodiesel em 8 h	(AGUIEIRAS et al., 2014)
<i>Penicillium restrictum</i>	Babassu	Tratamento de efluente	Efluente em condições de descarte	(ROSA et al., 2006)
<i>Rhizopus microsporus</i>	Cana-de-açúcar e semente de girassol	Produção de biodiesel	91 % de conversão de biodiesel em 48h	(ZAGO et al., 2014)

Como observado na tabela acima e conforme apresentado pela literatura, o PES

apresenta uma proposta de baixo custo para um atual problema do uso industrial de lipases: o alto custo de imobilização de enzimas. As lipases são extremamente versáteis para imobilização em suportes, sendo que várias técnicas podem ser usadas como: adsorção, ligação covalente em suporte, cross-linking e encapsulamento. Apesar disso, essas técnicas normalmente envolvem o custo de purificação da lipase e produção/obtenção do suporte. Por isso, evidencia-se o uso de PES como solução para ambos problemas, onde o próprio sólido cultivado pode ser usado para reter as lipases, fazendo com que o sólido apresente atividade lipolítica e possibilidade de reuso do biocatalisador (TAN et al., 2010). Alguns autores já reportaram ciclos de até 8 vezes com relativamente alta atividade comparado com primeiro uso, perdendo apenas cerca de 30 % de atividade (AGUIEIRAS et al., 2014).

## **2.2 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO**

O Cultivo de Estado Sólido (CES), também conhecido como Fermentação em Estado Sólido (FES), é amplamente estudado e aplicado para a produção de muitos produtos de alto valor agregado (enzimas, produtos farmacêuticos, aditivos alimentares e biocombustíveis) e aumentou a credibilidade nos últimos anos através de cultivo de substrato barato, se adequando melhor a países em desenvolvimento. Definido como cultivo de substrato sólido sob ausência ou quase ausência de água livre, este processo se assemelha ao *habitat* natural de alguns microrganismos, sendo um excelente ambiente para estes crescerem (EDWINOLIVER et al., 2010; SINGHANIA et al., 2009).

Com o desenvolvimento da penicilina, na década de 1940, usando processos de Cultivo Submerso (CSm), também conhecido como fermentação submersa, as pesquisas em CES ficaram negligenciadas dado a importância da penicilina durante a guerra. Por isso, o CSm acabou se tornando um modelo de tecnologia para produção de compostos por fermentação (SCHMIDELL et al., 2001).

Pandey et al. (2000) concluíram que, uma vez que o CES é mais difícil de lidar com grandes quantidades de substrato e produtos, sua aplicação pode ser mais vantajosa para situações de produtos de "baixo volume - alto custo", como biocatalisadores, antibióticos e biofármacos. Em comparação com o cultivo submerso, alguns estudos afirmam melhores rendimentos usando CES para a produção de certos bioprodutos como enzimas (GALPERIN; COCHRANE, 2009; GUTARRA et al., 2009;; WOLSKI et al., 2009). Ashok et al. (2017),

afirmam que, para alguns produtos, espera-se que o CES substitua o CSm, proporcionando maior capacidade e rendimento em alguns processos (ASHOK et al., 2017).

### **2.2.1 Parâmetros que afetam o cultivo**

Os processos biotecnológicos para a produção de enzimas requerem um alto nível de controle de parâmetros para obter produtos com características constantes e uniformes. Alguns parâmetros de cultivo, denominados "variáveis operacionais", são fatores cruciais para a alta produção enzimática, como pH, temperatura, tamanho de partícula, porosidade, oxigênio, aeração, atividade da água, composição do substrato e umidade (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Conforme afirmado por Mitchell et al. (2006), o crescimento de microrganismos tende a mudar as condições de cultivo para longe do ótimo da produção de certas enzimas. Portanto, é necessária a manipulação desses parâmetros no biorreator para ter condições ideais e aumentar a produção (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006; PANDEY, 2003).

A maioria dos produtos do CES e o crescimento do microrganismo são diretamente afetados pelo pH, que é um dos parâmetros mais difíceis de manter devido à heterogeneidade do CES. Para alcançar o nível de pH desejável, em casos de resíduos agroindustriais ou matéria-prima de biomassa, a utilização de soluções tampão é comum durante o processo de umidificação, permitindo que o substrato atinja o nível ótimo de pH (SCHMIDELL et al., 2001).

A temperatura é também um dos principais parâmetros que afetam o cultivo microbiano, além de ser um fator crucial no CES. De acordo com Schmidell et. al. (2001), a temperatura afeta diretamente a germinação de esporos, a formação de produtos, o crescimento microbiano e a esporulação. Portanto, o calor gerado pelo metabolismo microbiano precisa ser dissipado para evitar problemas no cultivo, como no caso da produção de lipase, esse excesso de calor pode levar à desnaturação e perda de atividade enzimática (PANDEY, 2003; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

No cultivo em estado sólido, o substrato utilizado deve ter algumas características ótimas para permitir um melhor rendimento do processo, tais como: porosidade, forma e tamanho da partícula. Em relação ao tamanho de partícula, quanto menor a partícula, maior a sua área superficial e, assumindo que as reações ocorrem na superfície, maiores taxas de conversão. Mas, é sabido que partículas menores tendem a compactar em reatores de coluna

de leito fixo, levando a dificuldades na aeração, gás e dissipação de calor, o que pode causar diminuição no rendimento do processo. Outra característica importante do substrato é a sua porosidade, que pode afetar a forma como os nutrientes são transferidos do meio sólido para o microrganismo e como as enzimas lignocelulósicas podem atuar sobre a biomassa. O meio poroso pode absorver água e facilitar o transporte de enzimas e nutrientes entre substrato e microrganismos. Esta qualidade é altamente desejável em substratos, como a biomassa, que serve não apenas como suporte, mas como fonte de nutrientes que os microrganismos podem produzir enzimas para promover a degradação das estruturas de biomassa (PANDEY, 2003; SCHMIDELL et al., 2001).

O cultivo em estado sólido, embora definido como cultivo de substrato sólido sob quase ausência de água livre, requer certa quantidade de água no substrato para metabolismo e crescimento de microrganismos. A atividade da água é definida como a taxa de pressão de equilíbrio de vapor dos substratos em relação à água pura à mesma temperatura (SCHMIDELL et al., 2001). Este parâmetro é considerado um fator crítico em CES, pois pode afetar o cultivo de várias formas, seja direta ou indiretamente. Sabe-se que ao controlar a atividade da água é possível modificar a produção metabólica ou a excreção de enzimas em microrganismos. Cada microrganismo possui um nível mínimo de atividade da água necessário para suas atividades metabólicas, sendo em torno de 0,7 para fungos, 0,8 para leveduras e 0,9 para bactérias (SCHMIDELL et al., 2001). Além disso, esse parâmetro pode alterar o comportamento de crescimento em microrganismos, por exemplo: em crescimento de fungos filamentosos em CES, maior atividade da água favorece a esporulação, enquanto a baixa atividade da água favorece a germinação de esporos ou o crescimento do micélio (PANDEY, 1992, 2003; SCHMIDELL et al., 2001).

Para o cultivo em estado sólido, o substrato pode ser natural ou sintético, dependendo do processo e do produto final. Em geral, a maioria dos substratos utilizados são biomassa ou resíduos agroindustriais, sendo que é preferido o resíduo agroindustrial por seu baixo custo. Os resíduos agroindustriais podem ser usados para o CES não apenas como suporte, mas como fonte de carbono e nutrientes, nos quais a suplementação com macro e micronutrientes pode ser necessária para permitir um crescimento ótimo. Na maioria dos casos, dependendo do resíduo utilizado, um pré-tratamento é necessário para um melhor crescimento de microrganismos e transporte de nutrientes. Esses pré-tratamentos podem incluir tratamentos físicos (moagem e trituração), tratamentos químicos (correção do pH, suplementação de

nutrientes e hidrólise ácida e básica) e tratamentos térmicos (pasteurização, esterilização por aquecimento e vaporização). Note-se que alguns processos de esterilização térmica podem causar modificações nas características do substrato, como textura e qualidade nutricional, que afetam diretamente o processo CES. No entanto, é possível evitar tais modificações, bem como possíveis contaminações, adicionando maior quantidade de inóculo, em vez disso de submeter o substrato à esterilização térmica (SCHMIDELL et al., 2001; SOCCOL et al., 2017).

O conteúdo de umidade no substrato para o cultivo de estado sólido é um dos fatores mais importantes para o sucesso do cultivo. Umedecer adequadamente o substrato pode levar a melhores resultados, facilitando a transferência de nutrientes e massa. No entanto, altos níveis de umidade do substrato podem levar à menor porosidade do substrato, o que pode resultar em uma aeração pobre e baixa troca de gás dentro do substrato. Por outro lado, baixos níveis de umidade podem levar a uma má difusão e transporte de nutrientes, resultando em menor taxa de crescimento do microrganismo (SINGHANIA et al., 2009).

Alguns CES requerem oxigênio para crescimento de microrganismos ou para síntese de produtos e, portanto, é necessário aerar o substrato de forma eficiente. A aeração de CES também pode desempenhar um papel significativo no controle de temperatura e gás, pois promove uma melhor troca de calor e massa, evitando a perda de produto para altas temperaturas e acumulação de CO<sub>2</sub>. No entanto, observa-se que a aeração forçada pode promover a secagem e a contaminação do substrato se não forem tomadas medidas adequadas, como a umidificação do ar e a esterilização/filtração do mesmo (SCHMIDELL et al., 2001).

### **2.2.2 Tipos de biorreatores para CES**

Os biorreatores podem ser divididos em várias classes (estático e agitado; aerado e não aerado; escala de bancada e escala industrial; batelada e contínuo), dependendo da perspectiva e da ênfase da aplicação. Mitchell et al. (2006) dividiu os biorreatores de CES em 4 grandes grupos, conforme visto no esquema da Figura 4, onde os grupos estão divididos de acordo com a agitação e aeração. No grupo 1, os biorreatores têm leito estático, com ar na volta, mas não soprados através do leito (ex.: biorreatores de bandeja); No grupo 2, os biorreatores têm leito estático ou o leito é misturado uma vez por dia, mas com o ar soprado vigorosamente através do leito (ex.: biorreatores de leito empacotado); No grupo 3, o leito dos biorreatores é

continuamente misturado e o ar circula ao redor do leito mas não forçadamente através dele (ex.: biorreator de tambor rotativo); No grupo 4, o leito é agitado e o ar passa forçado através do leito (ex.: biorreatores de leito fluidizado) (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006).

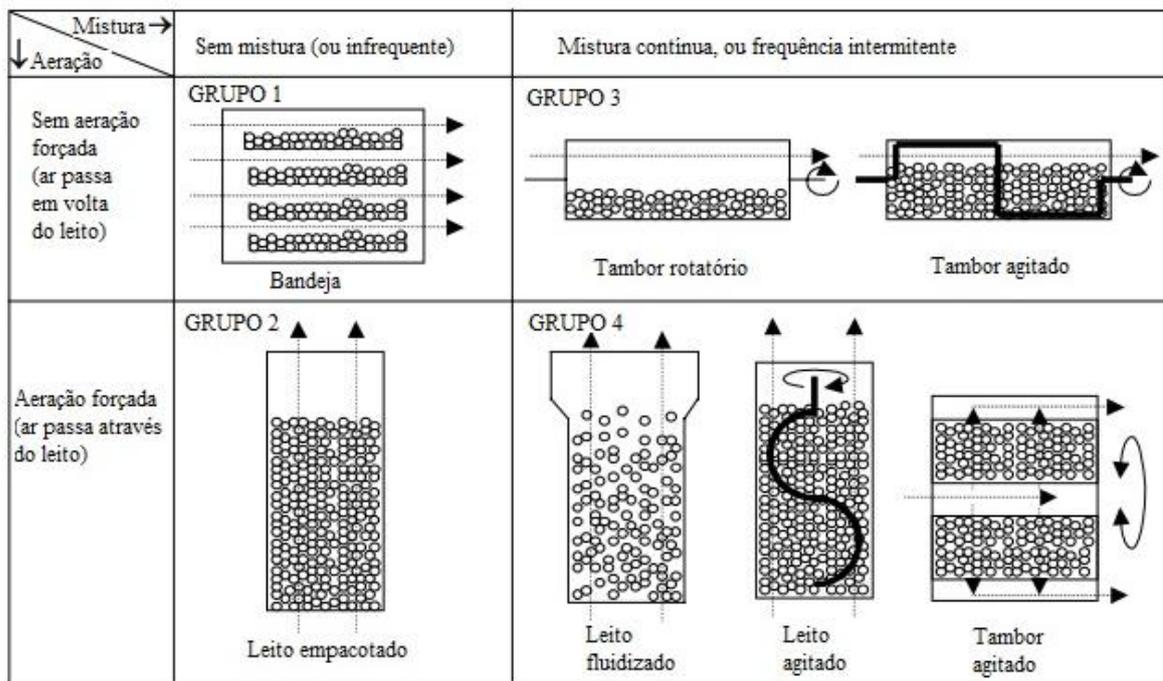


Figura 1 – Configuração básica dos diferentes biorreatores para cultivo em estado sólido.

Fonte – Adaptado de (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006)

No cultivo em estado sólido, para a produção de lipases, os tipos mais comuns de reatores utilizados são reatores em batelada (não contínuos), nos quais nutrientes e substrato são adicionados ao reator, então o substrato é inoculado e incubado por um período de tempo. Mais tarde, produtos como enzimas são extraídos por suspensão com soluções tampão, água ou solventes e purificados para uso biotecnológico (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013; TOSCANO et al., 2012).

### 2.3 BIORREFINARIA

Com a rápida ascensão econômica mundial movida pelo aumento do uso de combustíveis fósseis, diversos fatores foram negligenciados. A rápida expansão trazida pelos combustíveis fósseis deixou um rastro de efeitos colaterais percebidos apenas recentemente como mudanças climáticas globais, aumento sem precedentes de resíduos gerados pela

indústria e falta de alternativas sustentáveis para problemas energéticos. Até recentemente, resíduos eram gerados e descartados da maneira mais barata possível sem preocupações ambientais e sociais. Com o aumento da consciência sobre os temas de poluição ambiental, combustíveis renováveis e alternativas sustentáveis de produção, surge o conceito de biorrefinaria como forma de alternativa sustentável. A biorrefinaria é o complexo integrado de produtos e processos sustentáveis que visa o uso de uma matéria-prima renovável, que pode ser biomassa ou resíduos industriais, para geração de produtos como biocombustíveis, bioquímicos, bioprodutos e bioenergia. Os processos de biorrefinaria podem ser divididos pelos tipos de processos utilizados para conversão, que podem ser químicos, termoquímicos ou bioquímicos (EICHLER et al., 2015; MOHAN et al., 2016).

Processos químicos são exclusivamente baseados em reações químicas de formação ou rompimento. No caso da biorrefinaria, a biomassa é primeiramente separada em frações, como celulose, hemiceluloses e lignina, que podem ser usadas para o processamento químico. O tipo do processo químico usado depende de fatores como a quantidade de substrato ou reagente recuperado da biomassa e produto final de interesse. Alguns exemplos de processos químicos são: transesterificação química; hidroprocessamento; craqueamento catalítico; reações de Fischer-Tropsch (SANTOS; COLODETTE; QUEIROZ, 2013).

Os processos termoquímicos são caracterizados pela transformação de uma fonte renovável (biomassa ou resíduo) em produtos ou energia através de uso de calor para quebra e transformação dos compostos da biomassa. Através de processos termoquímicos como combustão e gaseificação, podem-se obter produtos como energia, gases energéticos, biolíquidos energéticos e cinzas. Os processos termoquímicos de conversão mais comumente usados são: combustão para produção de energia, gaseificação para produção de gás sintético e pirólise para produção de bioóleo (EICHLER et al., 2015; SANTOS; COLODETTE; QUEIROZ, 2013).

Processos bioquímicos, assim como os demais, necessitam de um estudo prévio de caracterização do resíduo a ser utilizado, pois a eficácia do processo é diretamente relacionada à composição da matéria-prima utilizada. Estes processos se utilizam de microrganismos e enzimas para conversões bioquímicas do substrato em produto de interesse. Os exemplos mais comuns e conhecidos de processos bioquímicos são: fermentação para produção de etanol, digestão anaeróbica para produção de biogás e transesterificação para produção de biodiesel. Apesar de bem estudados os processos bioquímicos para produção de

biocombustíveis, os processos também podem ser usados para produção de alimentos, tais como: chocolate, molho de soja, vinhos, cerveja, koji, queijo, iogurte, entre outros (WOOD, 2012).

### **2.3.1 Composição química de resíduos agroindustriais**

O melhor entendimento da estrutura da biomassa e de seus constituintes é de fundamental importância para a determinação dos parâmetros dos processos para a máxima obtenção de produtos de alto valor agregado dos resíduos agroindustriais. Os principais componentes químicos dos resíduos agroindustriais são a celulose, hemicelulose e lignina, além de pequena quantidade de cinzas e extrativos. A concentração de cada um desses componentes depende do tipo de biomassa, tipo de tecido, da idade da planta, das condições de crescimento e dos processos industriais que a biomassa foi submetida (EICHLER et al., 2015).

A grande dificuldade encontrada hoje na conversão dos resíduos agroindustriais em bioprodutos e biocombustíveis é devido à natureza recalcitrante dos compostos químicos da biomassa, onde as fibras de celulose são envolvidas na matriz amorfa de hemicelulose e lignina. Naturalmente, essa matriz serve contra ataques de microrganismos, enzimas, reagentes químicos e estresses mecânicos, protegendo as plantas. Devido a essas características, o pré-tratamento da biomassa é imprescindível para os processos de biorrefinaria posteriores. Os tipos de pré-tratamentos se dividem em: físicos, com moagem, trituração e aquecimento; químicos, onde são utilizados agentes como: solventes, ácidos e bases e; biológicos, que consistem no uso de enzimas ou microrganismos que degradam os substratos lignocelulósicos pela hidrólise de ligações glicosídicas (SANTOS; COLODETTE; QUEIROZ, 2013).

A celulose é um dos polímeros mais abundantes no planeta, sendo observado em todas as plantas e algas como estrutura de suporte. Apesar de ser quimicamente simples, sendo composta apenas por glicoses unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, sua estrutura morfológica em plantas superiores é complexa e heterogênea. A celulose também é intimamente associada, através de ligações de hidrogênio e ligações covalente, com outros polímeros como lignina, pectina e hemiceluloses, tornando a sua morfologia ainda mais complexa (SIRÓ; PLACKETT, 2010). A estrutura da celulose pode ser classificada em 3

níveis: O primeiro é a sequência de resíduos  $\beta$ -D-glicopiranosídicos, formando o homopolímero de fórmula geral:  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , representado na Figura 1; O segundo é a organização espacial resultante da união dos homopolímeros de primeiro nível, formando diferentes ângulos estruturais pelas ligações de hidrogênio intramoleculares; O terceiro é a formação de estruturas cristalinas com ligações intermoleculares de hidrogênio, entre moléculas de celulose, conferindo ao polímero alta resistência mecânica (SANTOS; COLODETTE; QUEIROZ, 2013).

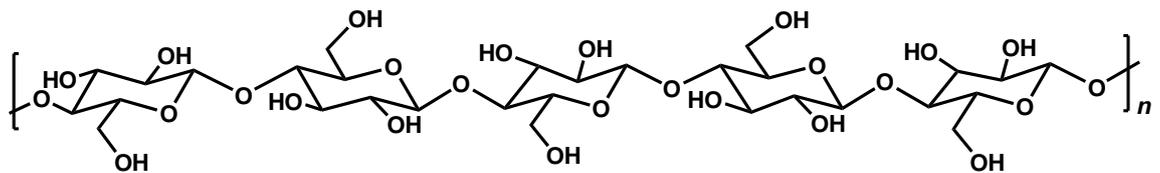


Figura 2 – Representação da molécula de celulose.

Fonte: (SANTOS et al., 2012).

As hemiceluloses são homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos complexos, compostos por cadeias menores que a celulose. Sua composição química pode variar de acordo com diversos fatores como tipo de vegetal, espécie, tipo de tecido, estágio de desenvolvimento do tecido e condições de crescimento. Pode ser composto de D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metilglucurônico. Por causa de suas ramificações, as hemiceluloses acabam sendo mais suscetíveis à hidrólise, característica atribuída ao seu caráter amorfo. Na Figura 2 é mostrada a representação esquemática da hemicelulose, com uma xilose como representação gráfica (SANTOS et al., 2012).

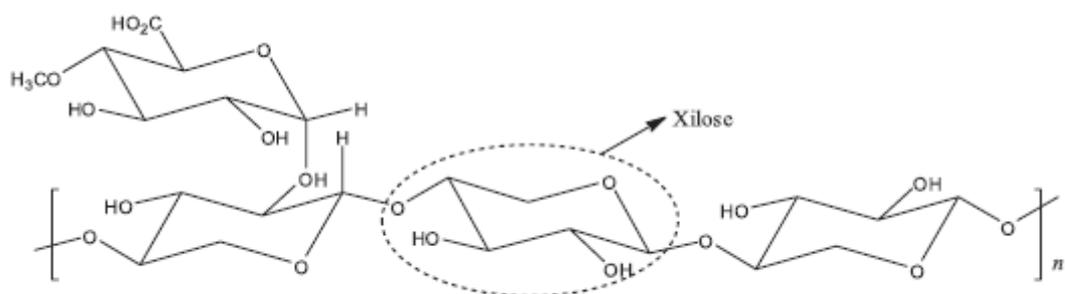


Figura 3 – Representação da molécula de hemicelulose.

Fonte: SANTOS *et al.*, 2012.

A lignina é um biopolímero aromático, constituinte da parede celular das plantas vasculares, construída a partir de acoplamento oxidativo de três principais unidades de fenilpropanos (álcool p-cumarílico, álcool sinapílico e álcool coniferílico). Ligações entre as unidades formam estruturas randômicas em uma estrutura tridimensional nas paredes celulares. Além dos 20 tipos de ligações presentes na lignina, esse biopolímero ainda pode ser associado a polímeros de hemiceluloses (XIAO; SUN; SUN, 2001). A representação esquemática da lignina de eucalipto é mostrada na Figura 3.

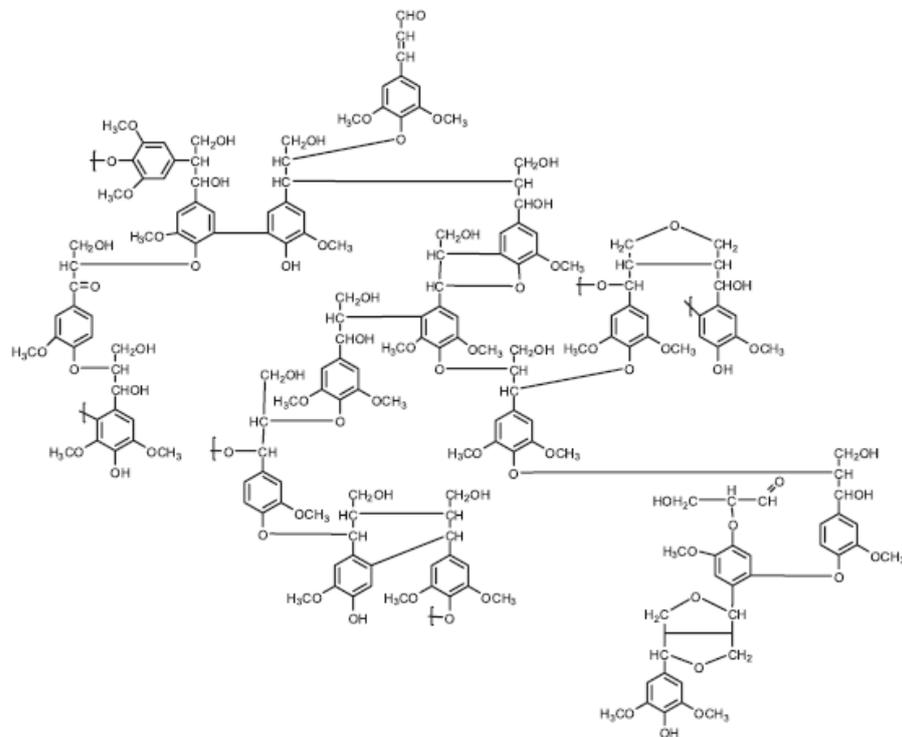


Figure 4 – Representação esquemática da lignina.

Fonte: SANTOS *et al.*, 2012.

### 2.3.2 Bagaço de malte: usos, disponibilidade e mercado

O resíduo mais abundante em uma cervejaria é o bagaço de malte, compondo aproximadamente 85 % do total de resíduos dessa indústria. Este resíduo está disponível a baixo custo, ou até sem custo, durante o ano inteiro e em grandes quantidades, sendo gerados tanto em cervejarias de grande porte quanto microcervejarias. No Brasil, atualmente o quarto

maior produtor de cerveja do mundo, foram produzidos 140 milhões de hectolitros em 2016, gerando aproximadamente 2,8 milhões de toneladas de bagaço de malte (MARCUSO; MULLER, 2012). Este resíduo, normalmente, se encontra disponível logo após o processo de brassagem, ou sacarificação, onde o bagaço sai da batelada com uma temperatura de aproximadamente 75 °C. O resíduo de bagaço de malte, ao final do processo, é considerado um resíduo rico em material lignocelulósico, rico em proteína (cerca de 20 %) e fibras (cerca de 70 %) (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006). Dado sua composição nutritiva, o bagaço de malte já é estudado em diversas aplicações como: suplemento de comida animal (em ração de gado e porcos), nutrição humana (usando o bagaço para fazer pão, biscoitos e suplemento), energia (combustão direta, fermentação anaeróbica para produção de biogás e produção de etanol), carvão vegetal, papel e substrato em cultivo de microrganismos (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006). O bagaço de malte, por possuir valor nutritivo relativamente alto e disponibilidade em grandes volumes, se tornou um substrato interessante para uso em processos biotecnológicos. Alguns trabalhos já reportam o uso de bagaço de malte para cultivo de microrganismos com a finalidade de produzir enzimas ou outros bioprodutos de interesse como: amilases, etanol, xylanases, proteases e ácido láctico (ALIYU; BALA, 2013; TERRASAN; CARMONA, 2015; XIROS; CHRISTAKOPOULOS, 2009). Não é do conhecimento do autor algum trabalho, até o presente momento, que usou bagaço de malte para produção de lipases através de CES de microrganismos.

# Capítulo 3 - Materiais e Métodos

## 3.1 MATERIAIS

Todos os experimentos foram realizados no Bioteclab (Laboratório de Bioprocessos e Biotecnologia), localizado no ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Óleo de soja usado nos cultivos foi óleo de soja comercial de cozinha, comprado em mercado local. O bagaço de malte foi fornecido gentilmente pela cervejaria Ralf Beer, da cidade de Alvorada, Brasil, logo após o processo de brassagem na cervejaria, e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a utilização. O bagaço de malte não sofreu nenhum processamento para realização dos cultivos, sendo usado na mesma forma que foi coletados da empresa. Todos reagentes químicos usados são de qualidade analítica, comprados na Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

## 3.2 MICRORGANISMO E SELEÇÃO

Para avaliar o microrganismo com melhor produção de lipase, quatro organismos foram pré-selecionados do estoque do Bioteclab (Laboratório de Bioprocessos e Biotecnologia da UFRGS), sendo eles: 2 fungos filamentosos (*Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium paneum*), 1 levedura (*Meyerozyma guilliermondii*) e 1 bactéria (*Staphylococcus warneri*). Para seleção do microrganismo produtor de lipase, essas culturas existentes no Bioteclab foram submetidas à um cultivo em placas de Petri contendo agar ( $15\text{ g.L}^{-1}$ ) e tributirina ( $10\text{ g.L}^{-1}$ ) como fonte de carbono, onde a produção de lipases extracelulares é evidenciada através da formação de halos em volta do microrganismo.

Com isso, o fungo *Aspergillus brasiliensis* 157f foi selecionado pelo maior halo formado e utilizado para o cultivo em estado sólido. Este microrganismo foi isolado do ambiente e identificado pelo grupo do Bioteclab, em estudos prévios, e mantido em estoque liofilizado. No estudo do grupo, o fungo foi isolado e identificado como maior produtor de xylanase,  $\beta$ -xylosidade e  $\beta$ -glicosidase, onde neste mesmo estudo, também foi mostrado que, além de alta produção de enzimas líticas, o microrganismo apresentou bom perfil de produção de xilooligosacarídeos, mostrando potencial para seu uso em CES (DA SILVA MENEZES; ROSSI; AYUB, 2017).

### **3.3 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE**

Os testes de caracterização da biomassa foram feitos em triplicata, onde o resultado final é a média dos resultados obtidos. O bagaço de malte foi caracterizado por seu conteúdo de: lipídios, açúcares redutores, cinzas, umidade, proteínas totais e conteúdo químico: celulose, hemiceluloses e lignina.

#### **3.3.1 Análise de lipídios**

O conteúdo de lipídios foi medido através da extração direta em Soxhlet utilizando éter de petróleo como solvente em um extrator automático SOXTEC Avanti 2055. Para a análise, tira-se a medida da pesagem dos cartuchos de alumínio secos, colocando-os no extrator automático, juntamente com aproximadamente 2 g de amostra para cada cartucho usado. Ao final da análise, os cadinhos foram colocados para secar e pesados, onde o valor de lipídios é calculado pela diferença de peso dos cadinhos antes e depois da extração.

#### **3.3.2 Análise de umidade**

O teor de umidade do bagaço de malte foi medido por gravimetria usando um analisador infra-vermelho de umidade (Ohaus MB32), usando-se amostras de aproximadamente 2,5 gramas de bagaço de malte.

#### **3.3.3 Análise de açúcares redutores**

Os açúcares redutores foram medidos pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) e os resultados foram lidos no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm, conforme Miller (1959) (MILLER, 1959).

#### **3.3.4 Análise de proteínas totais**

O teor de proteína total foi medido usando o método de Kjeldahl, com o fator 6,25 conforme Horwitz (1975). A equação 1 foi usada para calcular a percentagem de proteína da amostra (HORWITZ, 1975).

$$\% \text{ proteínas} = \frac{K \times V \times \text{Fator}}{P} \quad (1)$$

Equação 1 – Fórmula para cálculo de porcentagem de proteínas.

Onde:

$K = FC \times 0,0014 \times 100.$

P = Peso da amostra (g).

FC = Fator de correção da solução de ácido sulfúrico a 0,1 N.

V = Volume da solução de ácido sulfúrico 0,1 N gasto para titular (mL).

Fator = Fator de conversão do nitrogênio para proteína (6,25).

### **3.3.5 Análise de cinzas**

As cinzas foram determinadas de acordo com a literatura, usando-se 1 g de amostras bagaço de malte (massa seca) (SILVA; QUEIROZ, 2002).

### **3.3.6 Análise de composição química**

A caracterização química (celulose, hemiceluloses e lignina) foi realizada de acordo com Rocha (2000) apud Gouveia (2009), onde colocou-se 300 mg de amostra moída seca em um tubo de vidro com 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72 % (p/p) em um banho maria a 30 °C por 60 min. Em seguida, utilizou-se 80 mL de água destilada para lavar os tubos, colocando o conteúdo em um frasco tipo Erlenmeyer 125 mL, autoclavando por 121 °C por 60 min para hidrólise. A amostra foi filtrada em vidro sinterizado (previamente tarado), passando o conteúdo filtrado para um balão volumétrico de 100 mL, avolumando o conteúdo com água destilada. Para o teor de lignina insolúvel, colocou-se o filtro de vidro na estufa até secagem e pesou-se o conteúdo (cinzas + lignina). A amostra líquida foi filtrada em membrana de celulose 0,22 µm para medição em HPLC. Os teores de açúcares foram medido em HPLC com coluna HPX-87H a 45 °C, com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mM) como fase móvel, com fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> utilizando os cálculos da literatura para encontrar os percentuais de celulose, hemiceluloses e lignina (GOUVEIA et al., 2009).

## **3.4 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO**

O cultivo em estado sólido, para o planejamento experimental, foi realizado com frascos de vidro tipo Erlenmeyer de 125 mL, com 10 g de substrato total (bagaço de malte + óleo), onde as porcentagens de cada cultivo foram determinadas pelo planejamento experimental. Pesou-se a quantidade de bagaço de malte para cada tratamento conforme planejamento

experimental e em seguida os frascos com substrato foram autoclavados a 121 °C durante 15 min e adicionou-se, em câmara de fluxo laminar, o tampão autoclavado correspondente, o óleo de soja autoclavado nas medidas de acordo com planejamento e o inóculo conforme descrito abaixo. Em seguida, os frascos foram tapados com bucha de algodão e colocados em estufa, sem agitação, com temperatura controlada conforme planejamento. Para realizar as análises de atividade de lipase e pH, um frasco de vidro era retirado para cada tratamento em cada tempo de análise.

Para o inóculo dos cultivos, *A. brasiliensis* foi cultivado em placas de Petri em meio de dextrose de batata (34 g.L<sup>-1</sup>) e agar (15 g.L<sup>-1</sup>) durante 7 dias a 37 °C para a coleta de esporos. O inóculo foi feito adicionando 10 mL de solução de Tween 80 (0,01 %) na placa cultivada, com raspagem suave para a coleta de esporos. O conteúdo foi posteriormente centrifugado (4500 rpm, 20 °C) e ressuspensão em água destilada autoclavada. Os esporos foram contados na câmara de Neubauer e o inóculo foi feito com 10<sup>6</sup> esporos por grama de bagaço de malte.

Para fins de padronização, foi determinada a quantidade máxima de retenção de líquidos no bagaço, mas ainda permitindo que o cultivo fosse caracterizado como estado sólido, ou seja, sem água livre. O volume adicionado de soluções tampão para o bagaço para ter a quantidade máxima de água incorporada à biomassa, foi determinado em 30 % do peso do bagaço de malte.

O teor de proteína solúvel foi analisado utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Para as medições de pH, utilizou-se um medidor de pH digital (Kasvi), onde 5 g de substrato cultivado foram pesados em um frasco de vidro tipo Erlenmeyer e 50 mL de água destilada foram adicionados. A mistura foi homogeneizada, filtrada e os resultados foram obtidos no medidor digital de pH.

### **3.4.1 Delineamento experimental**

O Delineamento Composto Central (DCC) foi feito como planejamento experimental, para avaliar os parâmetros: porcentagem de óleo de soja, temperatura de cultivo e pH do tampão utilizado no início do cultivo. As variáveis independentes utilizadas e seus níveis são mostrados na Tabela 2. Neste planejamento experimental, foram realizados 16 tratamentos, com 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 2 pontos centrais. O planejamento e análise

experimental foram analisados usando-se o software STATISTICA 8.0 (Statsoft, USA). Foram feitos dois tipos diferentes de soluções tampão: para pH 6,0 ou superior, utilizou-se tampão de fosfato de sódio (0,2 M); e para pH inferior a 6,0, utilizou-se tampão de acetato de sódio (0,2 M). A atividade da lipase extracelular foi medida em diferentes tempos de cultivo (0, 24, 48, 72 e 96 h), onde o tempo com resultados mais elevados foi utilizado na análise DCC.

Tabela 2 – Variáveis analisadas com nível e (medida) do planejamento experimental.

Tratame	Variáveis		
	pH	Óleo de Soja (%)	Temperatura (°C)
1 (A)	-1 (5)	-1 (5)	-1 (25)
2 (B)	+1 (7)	-1 (5)	-1 (25)
3 (C)	-1 (5)	+1 (15)	-1 (25)
4 (D)	+1 (7)	+1 (15)	-1 (25)
5 (E)	-1 (5)	-1 (5)	+1 (35)
6 (F)	+1 (7)	-1 (5)	+1 (35)
7 (G)	-1 (5)	+1 (15)	+1 (35)
8 (H)	+1 (7)	+1 (15)	+1 (35)
9 (I)	-1,68 (4,68)	0 (10)	0 (30)
10 (J)	+1,68 (7,68)	0 (10)	0 (30)
11 (K)	0 (6)	-1,68 (1,6)	0 (30)
12 (L)	0 (6)	+1,68 (18,4)	0 (30)
13 (M)	0 (6)	0 (10)	-1,68 (21,6)
14 (N)	0 (6)	0 (10)	+1,68 (38,4)
15 (O)	0 (6)	0 (10)	0 (30)
16 (P)	0 (6)	0 (10)	0 (30)

#### 3.4.1.1 Validação do modelo

Para a validação do modelo, resultante da análise estatística do software STATISTICA 8.0, um cultivo foi realizado, em triplicata, nas condições dadas como ótimas para o cultivo. Neste caso, o modelo prevê o valor dito como ótimo resultante do cultivo. As análises de ensaio de atividade lipolítica e pH foram medidos conforme itens 3.4.2 e 3.4. Para obter

melhor perspectiva do cultivo, atividade de celulase e protease também foram medidas para os mesmos pontos de atividade lipolítica e pH, com resultados colocados no material suplementar.

### 3.4.2 Ensaio de atividade lipolítica

A atividade de lipase extracelular foi medida usando o extrato bruto do cultivo em estado sólido. Para a extração de lipase, foram pesados 5 g de substrato cultivado, adicionados 25 mL de tampão de fosfato de sódio (pH 7,0, 0,1 M) e colocados em agitador orbital a 37 °C 180 rpm por 30 min e filtrados com papel filtro qualitativo (80 g), resultando em um extrato enzimático bruto.

O ensaio de lipase foi realizado de acordo com Burkert et al. (2004), com pequenas modificações. Para as reações, adicionou-se 2,5 mL de uma emulsão de óleo de oliva (25 % v/v de óleo de oliva em suspensão com solução de goma arábica 70 g.L<sup>-1</sup>) a 1 mL de tampão de acetato de sódio (pH 5,0, 0,1 M) e adicionou-se 0,5 mL de extrato bruto (amostra) e incubou-se a 37 °C 180 rpm durante 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 7,5 mL de mistura de acetona-etanol-água (1:1:1 v/v), e os ácidos graxos livres foram titulados com solução de NaOH 0,02 M, usando 3 gotas de corante fenolftaleína como indicador. Para medição do branco, o extrato bruto foi adicionado após o reagente de parada (acetona-etanol-água). Uma unidade de atividade lipase (U.g<sup>-1</sup>) foi considerada a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto por grama de substrato cultivado (BURKERT, 2004). A Equação 2 mostra o cálculo realizado para encontrar a atividade de lipase através do método titulométrico.

$$Atividade \left( \frac{U}{g} \right) = \frac{(V_a - V_b) * M * 1000}{t * V_e} * Fator \quad (2)$$

Onde:

V<sub>a</sub> = Volume de titulação da amostra (mL).

V<sub>b</sub> = Volume de titulação do branco (mL).

M = Molaridade da solução de titulação NaOH (mol.L<sup>-1</sup>)

t = Tempo de reação (min).

V<sub>e</sub> = Volume de extrato bruto utilizado.

Fator = Quantidade de tampão usada para fazer o extrato bruto para fazer conversão de atividade de U.mL<sup>-1</sup> para U.g<sup>-1</sup> (5 mL.g<sup>-1</sup>).

### 3.4.3 Produção de lipase em biorreatores diversificados

As reações para o projeto experimental e a validação foram realizadas com frascos de 125 mL ou, como caracterizada por Mitchell et al. (2006), reatores de leito estático do Grupo 1, que geralmente são conhecidos como reatores de bandejas (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Para ter uma compreensão mais abrangente da produção de lipase, as condições otimizadas de produção de lipase foram utilizadas em diferentes tipos de reatores para simular uma maior produção de lipase. Foram selecionados dois tipos de biorreatores que poderiam ser usados para tal finalidade, reatores com aeração forçada através do leito e reatores de tambor agitado de escala piloto.

#### *3.4.3.1 Produção de lipase em biorreator cilíndrico com Passagem Forçada de Ar*

Para os cultivos em reatores com passagem forçada de ar, foram utilizados frascos de vidro cilíndricos, com 28 cm de altura, 5,5 cm de diâmetro na parte superior, com filtro de vidro sinterizado no fundo e formato cônico na entrada de ar, com 1,2 cm na parte inferior (distribuidor), conforme a Figura 5. De acordo com Mitchell et al. (2006), este experimento foi realizado em biorreatores de estado sólido do Grupo 2, em que o leito é estático, mas o ar é soprado com força pelo cultivo. O ar passou forçadamente pelo cultivo do bagaço de malte, com um fluxo de ar de  $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , depois de passar por um filtro de ar e um frasco com água destilada autoclavada para manter a saturação de água no ar. A saturação de água no ar é necessária para que não ocorra a secagem excessiva do cultivo pela passagem de ar seco. Para este experimento, foram utilizados 70 g de bagaço de malte autoclavado, com as proporções para a quantidade de tampão e óleo de soja sendo as mesmas dos resultados ótimos obtidos pelo modelo estatístico. Com finalidade de manter a temperatura do cultivo constante e conforme otimização do parâmetro, o cultivo foi realizado em incubadora sem agitação com controle de temperatura. Para avaliar o cultivo, os resultados de atividade da lipase, pH e proteína solúvel foram realizados conforme os itens: 3.4.2 e 3.4, explicados anteriormente.



Figura 5 – Frascos de vidro cilíndricos usados como biorreatores em estado sólido.

#### *3.4.3.2 Produção de lipases em biorreator de tambor agitado em escala piloto*

Para avaliar como o cultivo de bagaço de malte, nas condições ótimas do planejamento, poderia se comportar em uma escala piloto, simulando condições industriais, um cultivo foi feito em um biorreator cilíndrico de tambor agitado, visto na Figura 6, com circulação de ar através do leito, caracterizado por um biorreator de estado sólido, considerado por Mitchell como biorreatores do Grupo 3 (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Para isso, utilizou-se 3 kg de bagaço de malte não autoclavado, e porcentagens de óleo e pH do tampão foram proporcionalmente iguais ao do biorreator cilíndrico (Biorreator Grupo 2) e biorreatores de bandeja. Ao simular a escala piloto, por razões prática, não é realizado o tratamento térmico (autoclave) das soluções tampão e do óleo de soja, assim como do bagaço de malte. Assim como nos biorreatores anteriores, o fluxo de ar passou por um frasco de vidro contendo água destilada a fim de manter a umidade do ar em saturação de água. A agitação do reator foi feita de forma intermitente, para que ocorresse a homogeneização do cultivo.



Figura 6 – Visões externa e interna do biorreator cilíndrico de tambor agitado.

Fonte: (RUTSATZ, 2006).

### **3.5 PREPARADO ENZIMÁTICO SÓLIDO**

Para a produção do Preparado Enzimático Sólido (PES), utilizou-se bagaço de malte cultivado por 96 h, por conter maior atividade lipolítica, onde a fermentação foi feita com parâmetros ótimos em frascos cilíndricos (biorreatores do grupo 2), de acordo com o item 3.4.3.1. O bagaço de malte cultivado foi colocado em um liofilizador LGJ-12 sob vácuo por 24 h e em seguida foi estocado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até análises. Com o PES, foram realizados testes de atividade de lipase, conforme item 3.4.2, e testes de produção de ésteres etílicos conforme item 3.6.

### **3.6 TESTE DE REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO**

Para testar o PES, foi realizado um teste de reação de produção de ésteres etílicos, para avaliar a possibilidade de conversão de óleos em biodiesel. A reação foi feita em frascos de vidro de 50 mL contendo 5 g de óleo de soja e proporção molar de 6:1 (etanol:óleo) a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em agitador orbital a 180 rpm, durante 18 h, usando 750 mg de PES previamente liofilizado, que representa 15% (m/m) de óleo de soja. Após 18 h de reação, colocou-se 1 mL da reação e 1 mL de água destilada em um Eppendorf de 2 mL e centrifugou-se (2500 g, 7 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) utilizando, por fim, a fase superior para analisar os ésteres em cromatografia gasosa (Shimadzu, modelo GC-17), de acordo com a normativa Européia DIN EN 14103. Como padrão interno foi utilizado heptadecanoato de metila, dissolvido em solvente heptano em uma concentração de 10 mg/mL. A coluna usada foi DB-5 (30m x 0,25 mm ID, J&W

Scientific) sob temperatura de 300 °C, razão de split 1:30, temperatura do detector FID 310°C, gás Nitrogênio com fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, velocidade do aquecimento 10 °C/min até temperatura final de 310 °C. O percentual de concentração de ésteres etílicos foi calculado conforme equação 3.

$$C(\%) = \frac{\Sigma A - A_{PI}}{A_{PI}} \times \frac{C_{PI} \cdot V_{PI}}{M_{amostra}} \times 100\% \quad (3)$$

Equação 3 – Fórmula para cálculo de percentual de ésteres etílicos de ácidos graxos.

Onde:

C (%) = Concentração de ésteres etílicos;

ΣA = Soma da área total dos picos de ésteres alquílicos de C<sub>4</sub> até C<sub>24</sub>;

A<sub>PI</sub> = Área do pico correspondente ao padrão interno;

C<sub>PI</sub> = Concentração do padrão interno (10 mg/mL);

V<sub>PI</sub> = Volume do padrão interno (mL);

M<sub>amostra</sub> = Massa da amostra (mg)

## Capítulo 4 - Resultados e Discussão

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE

Para uma melhor compreensão das necessidades do microrganismo durante o cultivo em estado sólido, uma caracterização completa do bagaço de malte foi realizada. Os resultados permitem avaliar a real necessidade de suplementação do meio de cultivo com outras fontes de carbono ou nitrogênio, assim como sais ou outros nutrientes. De acordo com a literatura, alguns nutrientes são importantes para a produção de lipases, mas como o trabalho teve como objetivo a produção de lipases com menor custo possível, nenhum nutriente foi adicionado além de óleo de soja para indução de produção de lipases (TREICHEL et al., 2010). Os resultados para a caracterização da biomassa são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Caracterização do bagaço de malte.

<b>Bagaço de Malte</b>	
<b>Umidade (%)</b>	76,56 ±0,94
<b>Lipídios (%)*</b>	4,00 ±0,39
<b>Proteínas Totais (%)*</b>	15,06 ±2,27
<b>Cinzas (%)*</b>	3,64 ±0,09
<b>Açúcares Redutores (g.L<sup>-1</sup>)</b>	5,16 ±0,14

\*Base seca

Os valores de umidade encontrados neste trabalho foram semelhantes aos de Cordeiro et al. (2011), com 75,5% de teor de umidade na biomassa. Segundo Ascheri, (2007), o bagaço de malte caracteriza-se por seu alto teor de umidade, o que poderia aumentar os custos de transporte e o risco de contaminação (CORDEIRO, 2011). É sabido que existe uma quantidade mínima de umidade necessária para o cultivo de microrganismos, sendo que para fungos filamentosos, essa quantidade é mais baixa que para outros microrganismos, ficando entre 40-60 % (SINGHANIA et al., 2009). Neste trabalho, como a umidade do bagaço de malte é alta, e os cultivos são realizados com adição suplementar de umidade, as condições de umidade se tornam favoráveis para contaminações de bactérias e leveduras. Isto é observado

no cultivo de bagaço de malte não autoclavado em biorreator de tambor agitado em escala piloto, onde ocorreu contaminação no cultivo.

O teor de lipídios, bem como o conteúdo de cinzas (Tabela 2) foram comparáveis aos valores encontrados por Mello (2014) com 2,78% de cinzas e 4,44% de lipídios, em bagaço de malte (MELLO; MALI, 2014). Para efeitos de produção de lipase, o teor de lipídios presente no bagaço de malte pode não ser suficiente para a indução da produção desta enzima, tornando necessária a adição de óleo suplementar. Rao et al. (1993), produzindo lipase de *Candida rugosa* em estado sólido, notou que as variáveis mais significativas que afetam a produção de lipase foram o óleo, a uréia e a maltose (VENKATA RAO; JAYARAMAN; LAKSHMANAN, 1993). Apesar disso, Mahadik et al. (2002) afirma que a produção de lipase de vários microrganismos, como *Aspergillus* e *Rhizopus*, parece ser independente da adição do substrato lipídico, sendo o óleo apenas um fator indutor da produção de lipase (MAHADIK et al., 2002). Isso é coerente com o observado neste trabalho, onde maiores porcentagens de óleo, até um ponto, não aumentaram a produção de lipase. Uma vez que o cultivo foi realizado sem suplementação, a falta de nutrientes necessários poderia ser um fator determinante para a produção de lipase em vez do aumento de óleo.

#### 4.1.1. Caracterização química

Os resultados da composição de celulose, hemiceluloses e lignina são encontrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização química do bagaço de malte.

<b>Bagaço de Malte</b>	
<b>Celulose (%)*</b>	24,32 ±0,08
<b>Hemiceluloses (%)*</b>	22,27 ±0,05
<b>Lignina Solúvel (%)*</b>	3,79 ±0,01
<b>Lignina Insolúvel (%)*</b>	18,87 ±3,30

\*Base seca

A composição de hemiceluloses e lignina do bagaço de malte analisado foi semelhante aos valores encontrados por Mello et al. (2014) (com 23,41% de hemiceluloses e 26,13% de lignina) e Rekha et al. (2012) com 28,97% de hemiceluloses e 24,05% de lignina. O teor de celulose encontrado foi maior do que os valores relatados por Mello et al. (2014) e

Steinmacher et al. (2012), com 12,29% e 11,35%, respectivamente (MELLO; MALI, 2014; REKHA et al., 2012). Conforme afirmado por Santos, et. al. (2003), a composição química do bagaço de malte pode variar devido a diferentes variedades utilizadas, tempo de colheita, condições de maltagem de cevada e outras condições particulares para cada cervejaria. Sabe-se que fungos como os do gênero *Aspergillus* são produtores de celulasas, sendo inclusive usados em estudos de produção dessas enzimas (LIU et al., 2011). Sendo assim, as celulasas produzidas pelo fungo podem degradar a celulose do bagaço de malte, disponibilizando açúcares simples para seu metabolismo. Neste caso, maiores teores de celulose são desejáveis para servir de nutriente para crescimento do fungo.

#### 4.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

As condições experimentais e os valores da atividade da lipase são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições e atividade de lipase para 96 h de cultivo do planejamento experimental DCC.

Tratamento	Variáveis			Atividade Lipase (U/g) 96 h	
	pH	% óleo	Temperatura		
1	A	5	5	25	4,11 ±0,2
2	B	7	5	25	6,46 ±0,9
3	C	5	15	25	4,00 ±0,5
4	D	7	15	25	7,22 ±1,2
5	E	5	5	35	3,95 ±0,5
6	F	7	5	35	9,11 ±1,0
7	G	5	15	35	4,31 ±0,3
8	H	7	15	35	8,06 ±0,3
9	I	4,68	10	30	1,91 ±0,2
10	J	7,68	10	30	7,93 ±0,7
11	K	6	1,6	30	5,53 ±0,6
12	L	6	18,4	30	6,31 ±0,3
13	M	6	10	21,6	6,75 ±0,2
14	N	6	10	38,4	5,48 ±0,1
15	O	6	10	30	6,80 ±0,5
16	P	6	10	30	6,42 ±0,3

Na Figura 7 são apresentados os perfis das cinéticas de crescimento do microrganismo e atividade de lipase para resultados do planejamento de diferentes tempos: 0, 24, 48, 72 e 96 h, para os 16 tratamentos. Apesar de ter encontrado maior atividade de lipase a 96 h de cultivo, alguns autores apontam para maior tempo de cultivo (120 h) como sendo o melhor para alcançar maior atividade de lipase (COLLA et al., 2015; MAHADIK et al., 2002). Para melhor avaliar o CES dos tratamentos do planejamento experimental DCC em reatores de bandeja sem passagem forçada de ar, dados de atividade de lipase e pH foram coletados nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 h. Os resultados de atividade de lipase dos 16 tratamentos do delineamento experimental são mostrados na Figura 7, enquanto os dados dos perfis de pH para os cultivos nos mesmos tempos são mostrados na Figura 8.

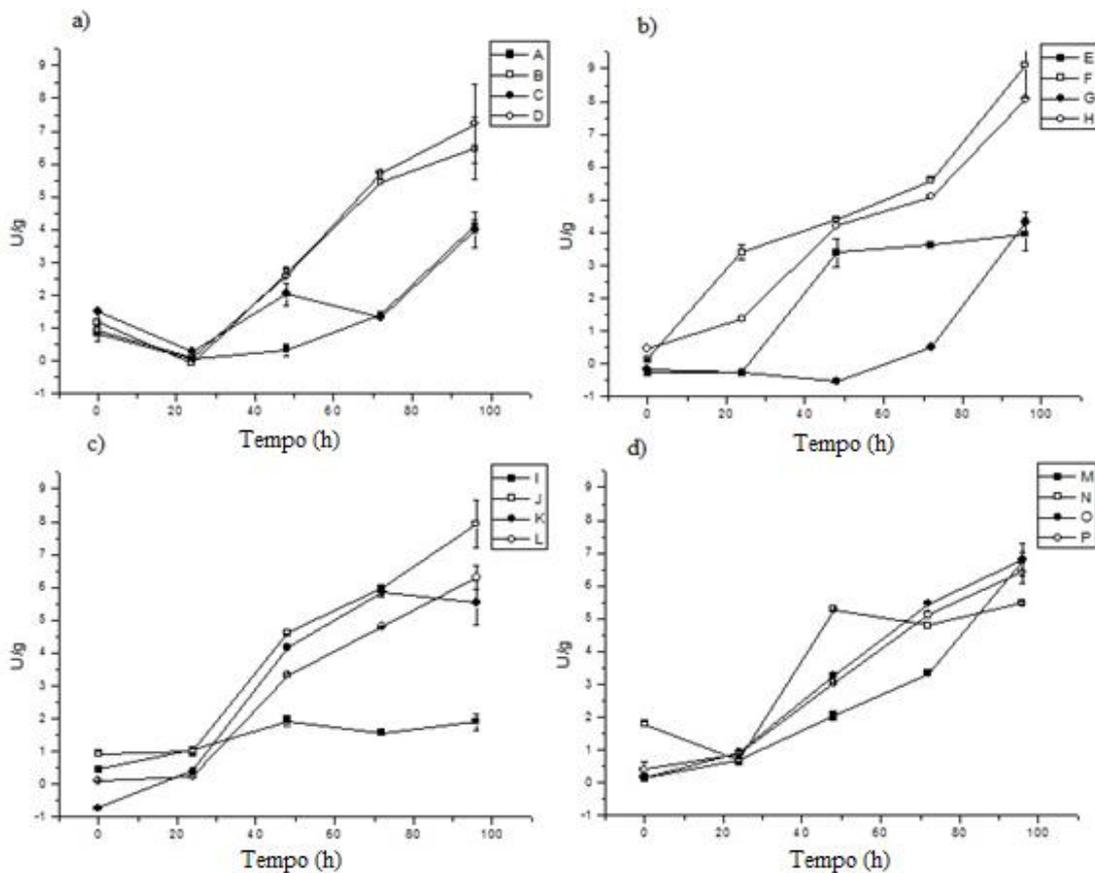


Figura 7 – Perfis de atividade de lipase para os resultados dos tratamentos do DCC para os tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 h, onde (a) são os tratamentos A, B, C e D, (b) são os tratamentos E, F, G e H, (c) são os tratamentos I, J, K e L e (d) são os tratamentos M, N, O e P.

Os resultados de atividade de lipase dos gráficos da Figura 7 mostram que a medida que aumenta o tempo de cultivo, para quase todos cultivos, a atividade de lipase também cresce, com exceção do tratamento K, onde a atividade em 96 h foi menor que em 72 h. Apesar de já esperados esses resultados, o objetivo de analisar os tempos diferentes de cultivo era de obter o tempo onde os melhores resultados de produção de lipase são observados e usar esses dados para o tratamento estatístico.

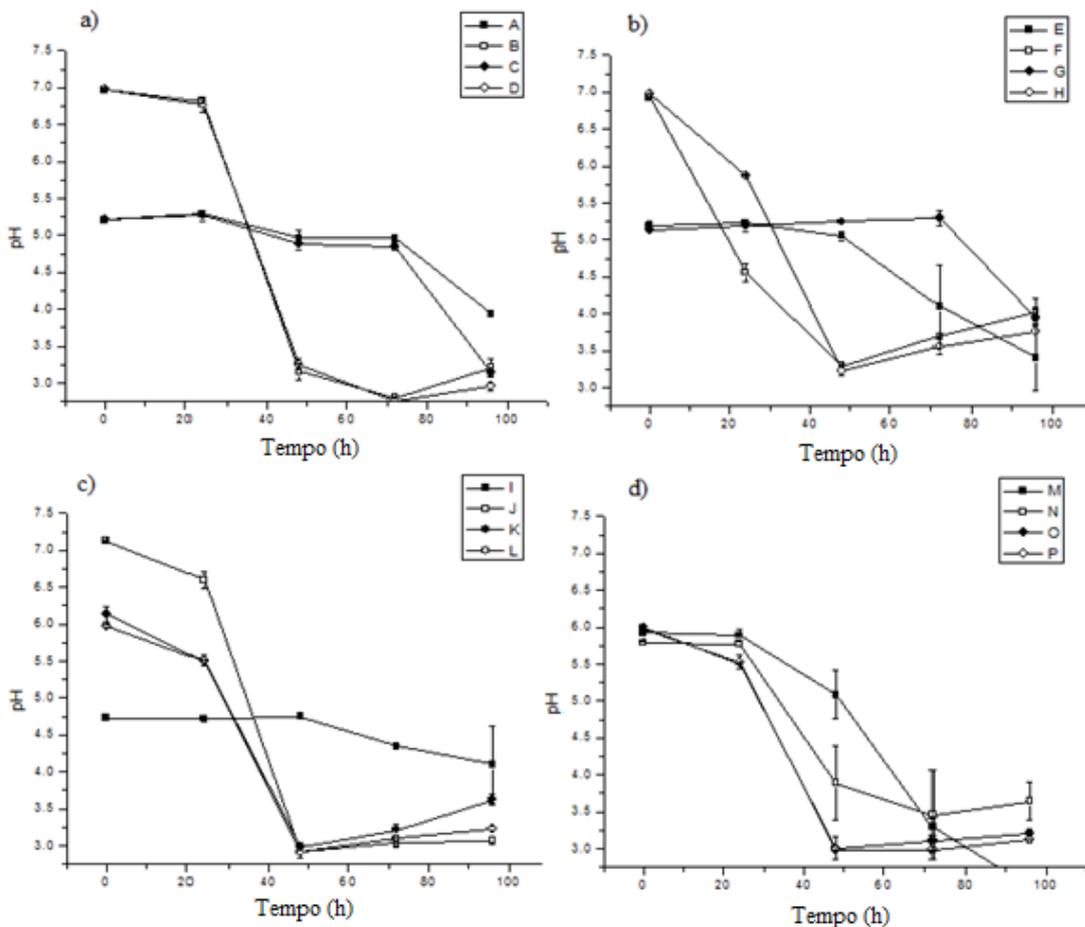


Figura 8 - Perfis de pH para os resultados dos tratamentos do DCC para os tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 h, onde (a) são os tratamentos A, B, C e D, (b) são os tratamentos E, F, G e H, (c) são os tratamentos I, J, K e L e (d) são os tratamentos M, N, O e P.

Os resultados dos perfis de pH para os cultivos dos tratamentos do DCC mostraram que, para diferentes níveis de pH utilizados nos cultivos, houve uma mudança no comportamento do perfil de pH. Os tratamentos que iniciaram com pH acima de 6,00 apresentaram uma queda

acentuada de pH em 48 h de cultivo, estabilizando posteriormente na faixa de pH 3,00 - 4,00. Aliado com esse comportamento, foi possível observar a mudança de coloração do cultivo para preto (cor dos esporos de *Aspergillus*). Cultivos que iniciaram com pH abaixo de 5,50 não apresentaram o mesmo perfil, não apresentando a mudança de coloração do cultivo para preta, conforme evidenciado em cultivo de *Aspergillus*.

Uma vez que em 96 h de cultivo apresentaram valores mais altos para a atividade da lipase, esses resultados foram utilizados para análises estatísticas de Delineamento Composto Central (DCC), onde a superfície ajustada das variáveis pH, temperatura e porcentagem de óleo, são mostrados na Figura 7.

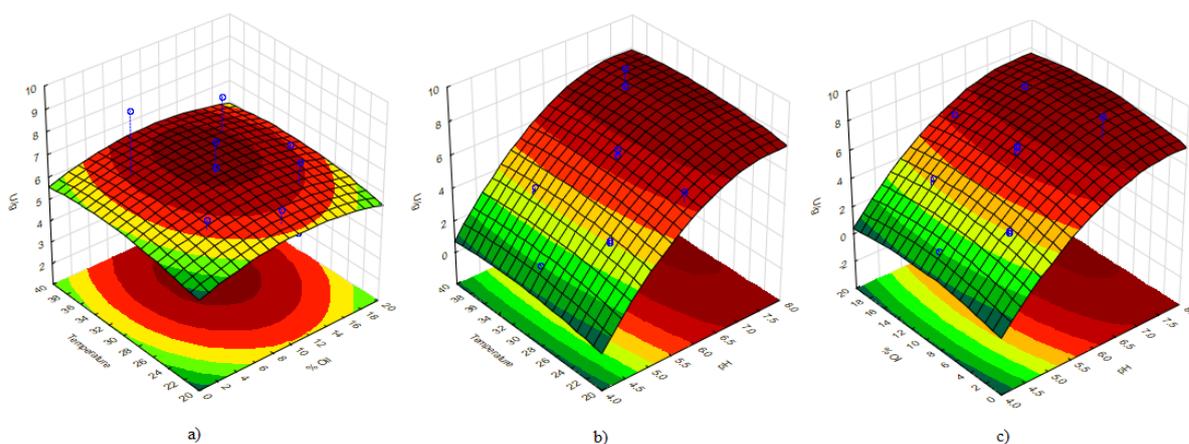


Figura 9 – Superfícies de resposta obtidas a partir da análise do DCC em 96 h de cultivo para (a) influência da temperatura e % óleo, (b) influência da temperatura e pH e (c) influência do % óleo e pH na atividade de lipase.

Para quase todos os tratamentos, obtiveram-se resultados de atividade de lipase superiores em 96 h de cultivo, sendo o melhor resultado o tratamento "F" com  $9,11 \text{ U.g}^{-1}$ , utilizando tampão fosfato de sódio pH 7,00, 5% de óleo de soja a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os menores valores de atividade encontrado foi no tratamento "I", com  $1,9 \text{ U.g}^{-1}$ , utilizando tampão de acetato de sódio com pH 4,68, 10 % de óleo a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Como pode ser visto na Figura 9 (b e c), para maiores valores de pH, há um aumento na atividade da lipase. E, como se observa em 9(a) e na Tabela 6, os valores ótimos para a atividade da lipase são estimados em torno de  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ , 11% de óleo. A Tabela 6 mostra os valores críticos previstos pela análise do DCC, bem como o valor previsto máximo da atividade da lipase em condições ideais de cultivo ( $8,17 \text{ U.g}^{-1}$ ). O

pH ideal e a temperatura obtidos neste estudo para a atividade da lipase fúngica são semelhantes aos já relatados na literatura, sendo em torno de 30-40 °C e pH 6,00 a 8,00 (COLLA et al., 2015). Colla et al. (2015) relataram atividade de lipase máxima (42,82 U.g<sup>-1</sup>) no cultivo de estado sólido de *Aspergillus niger* com pH 6,00 e temperatura de 35 °C, usando farelo de soja e casca de arroz. Valores ótimos de pH e temperatura encontrados por Farias et al. (2015), em CES de *Aspergillus candidus* em farelo de amêndoa para produção de lipase, foram pH 5,50 e 25 °C (CYNDY et al., 2015). No presente estudo, dois tipos de tampões diferentes foram utilizados para cobrir faixa de pH testada e, de acordo com Baron et al. (2005), os resultados para a produção de atividade lipase podem variar para diferentes tipos de soluções tampão (BARON; TURRA; MITCHELL, 2005).

Tabela 6 – Valores críticos e solução predita pela análise DCC.

<b>Valores Críticos; Variável: U/g; Solução: Valor máximo predito na solução: 8,170359</b>			
	<b>Observado - Mínimo</b>	<b>Valores Críticos</b>	<b>Observado - Maximo</b>
<b>pH</b>	4,31	7,71	7,68
<b>% óleo</b>	1,59	11,34	18,40
<b>Temperatura</b>	21,59	32,74	38,40

Como pode ser visto nos resultados da ANOVA, na Tabela 7, o efeito linear do pH foi significativo nos resultados finais da atividade da lipase ( $p < 0,05$ ). Além disso, a predição do modelo pode explicar 90,20 % dos resultados da atividade da lipase encontrados, como mostrado pelo valor  $R^2$  de 0,9020, sugerindo uma boa correlação entre os resultados experimentais e os valores teóricos preditos pelo modelo.

Tabela 7 – Resultados da ANOVA do DCC.

<b>ANOVA; Var.:U.g<sup>-1</sup>; R<sup>2</sup>=0,90207; Adj:0,83678; 3 fatores, 1 Bloco, 16 Tratamentos; MS Residual=0,5715301 DV: U.g<sup>-1</sup></b>					
	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>(1)pH (L)</b>	44,37315	1	44,37315	77,63922	0,000010
<b>pH (Q)</b>	2,55707	1	2,55707	4,47408	0,063531
<b>(2)% Óleo(L)</b>	0,11692	1	0,11692	0,20457	0,661762
<b>% Óleo(Q)</b>	0,27350	1	0,27350	0,47854	0,506536
<b>(3)Temperatura(L)</b>	0,16788	1	0,16788	0,29374	0,600993
<b>Temperatura(Q)</b>	0,09471	1	0,09471	0,16571	0,693462
<b>Erro</b>	5,14377	9	0,57153		
<b>Total SS</b>	52,52346	15			

\*SS = Soma dos quadrados; df = Grau de liberdade; MS = Média quadrática; F = Razão F; P = Razão p;

L = linear; Q = Quadrático.

Duas possíveis explicações para o efeito do pH no cultivo podem ser: tipo de solução tampão (tipo de sal utilizado) e nível de pH. Já que o tampão acetato foi utilizado para pH inferior a 6,00 e o tampão fosfato foi utilizado para pH 6,00 ou superior, a influência na atividade final da lipase pode ser devida tanto ao tipo de tampão quanto para o nível de pH ou a uma combinação de ambos os fatores. Outros estudos também encontraram o nível de pH como um fator contribuinte para a produção final de lipase, por exemplo em trabalho com *Rhodotorula glutini* e *C. rugosa*, encontraram a produção máxima de lipase a uma faixa de pH de 7,00 a 8,00, em cultivo em estado sólido com bagaço de cana de açúcar e solução de nutrientes (FERRAREZI et al., 2014). Além disso, Rekha et al (2012) encontraram maior produção de lipase a pH 6,00 enquanto cultivavam *Candida rugosa* sob cultivo em estado sólido a uma faixa de pH de 3,00 a 8,00.

Como é observado, obtiveram-se os maiores resultados de atividade de lipase com soluções tampão fosfato de sódio pH 7,00 e 7,60. Analisando os perfis de pH (Figura 8), medidos a 0, 24, 48, 72 e 96 h, pode-se observar que aqueles tratamentos com pH inicial de 6,0 ou superior tiveram uma queda súbita no nível de pH às 48 h, estabilizando posteriormente em uma faixa de pH de 3,00 a 4,00. Juntamente com esta diminuição súbita do pH em 48 h, nos mesmos tratamentos, observou-se a formação de esporos pretos, que normalmente são vistos em culturas esporulantes de *Aspergillus*. Em tratamentos com pH inicial inferior a pH 5,5, não foram observados esporos pretos até 96 h de cultivo. Embora outros estudos tenham mostrado porcentagem de óleo e temperatura como fatores significativos na produção de lipase, neste trabalho essas variáveis não foram significativas (REKHA et al., 2012; TREICHEL et al., 2010). Isso pode ser explicado pela não utilização de nutrientes e meio suplementar, o que limita a produção de lipase mesmo que seja adicionado mais óleo ou se a temperatura estiver em condições ideais para metabolismo celular. No presente trabalho, ao contrário da maioria, nenhum nutriente adicional foi adicionado no CES para avaliar a produção de lipase nas condições menos dispendiosas. Como mostra He e Tan (2006), alguns nutrientes em meio de cultura tiveram influência significativa na produção de lipase, como farelo de soja e  $K_2HPO_4$ , enquanto trabalhava com *Candida* sp (HE; TAN, 2006). Embora, muitos relatos tenham sido feitos para o uso de resíduos agroindustriais, a maioria deles usou suplementos como  $NH_4NO_3$ , extrato de levedura, peptona,  $NH_4C$  e  $NaNO_3$ , sugerindo que um fator importante é a relação C:N, que pode ser controlada por esta

suplementação (KEMPKA et al., 2008; MAHANTA; GUPTA; KHARE, 2008; TREICHEL et al., 2010).

#### 4.2.1. Validação

Usando valores críticos (pH 7,71, 11,34 % de óleo de soja e 32,74 °C) obtidos no modelo de previsão estatística (Tabela 6), o cultivo foi feito em triplicata, para validar o modelo. Para uma investigação mais aprofundada da dinâmica da cultura, a atividade de celulase e a atividade da protease foram medidas. Na Figura 10 são mostrados os resultados dos perfis para a atividade da lipase e para o pH.

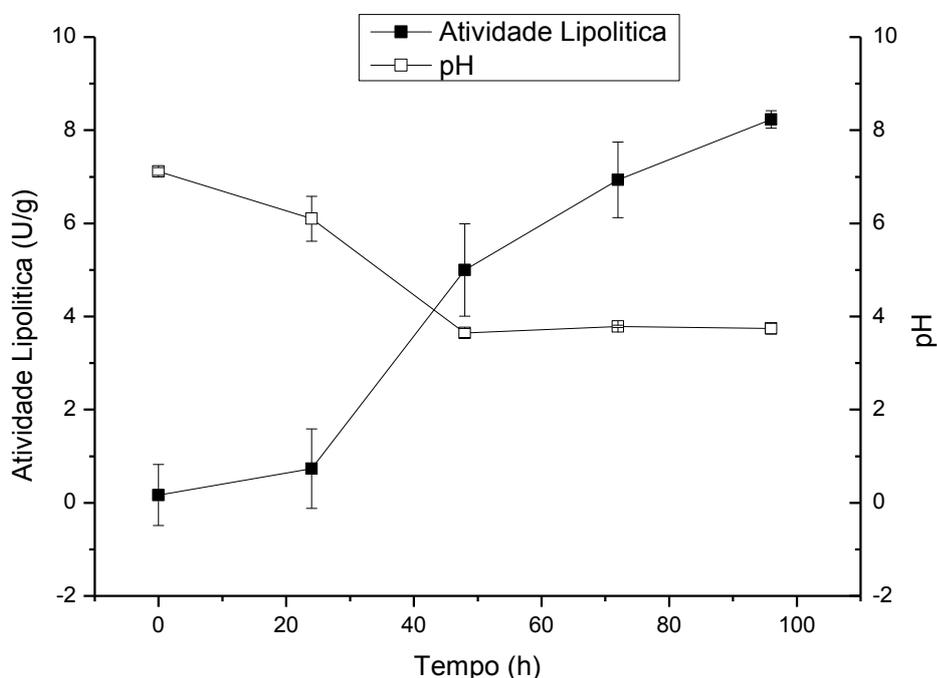


Figura 10 – Perfis de atividade lipolítica e pH do cultivo de validação do modelo estatístico.

Os resultados para a atividade da celulase, atividade protease, proteínas totais e açúcares redutores são mostrados na Figura 13, no Apêndice. Conforme observado na Figura 10, a atividade de lipase em 96 h de cultivo atingiu  $8,19 \pm 0,34 \text{ U.g}^{-1}$ , que é muito semelhante ao valor previsto pelo modelo estatístico ( $8,17 \text{ U.g}^{-1}$ ). Junto com a atividade da lipase, a atividade de celulases e a atividade de proteases também aumentaram com o tempo de cultivo, atingindo valores mais altos em 96 h, com  $7,93 \text{ U.g}^{-1}$  e  $6,91 \text{ U.g}^{-1}$ , respectivamente. Os

resultados para proteínas totais e açúcares redutores mostraram o que já era esperado, um ligeiro aumento no teor total de proteína solúvel e diminuição dos açúcares redutores totais (material suplementar).

### **4.3. PRODUÇÃO DE LIPASE EM BIORREADORES COM AERAÇÃO E BIORREADORES COM AGITAÇÃO**

#### **4.3.1. Biorreatores com aeração forçada em leito fixo**

O teste de produção de lipasenos biorreatores com ar forçado através de um leito fixo em reatores cilíndricos apresentou comportamento semelhante ao cultivo em frascos de vidro tipo Erlenmeyer de 125 mL, evidenciando queda de pH até 48 h e posterior estabilização na faixa de pH 3,00-4,00. Semelhantemente, o perfil de atividade lipolítica foi aumentando até alcançar maior ponto às 96 h de cultivo. No entanto, a atividade da lipase, neste cultivo de aumento de escala (Grupo 2), às 96 h ( $9,83 \text{ U.g}^{-1}$ ) foi maior que a encontrada em condições ideais para os biorreatores em frascos de 125 mL no mesmo tempo de cultivo ( $8,19 \text{ U.g}^{-1}$ ). De acordo com a literatura, os biorreatores de estado sólido com passagem forçada de ar através de leito fixo têm melhor transferência de calor e melhor capacidade para remover o calor metabólico do substrato (MITCHELL et al., 2000). Mo et al. (2004) também relataram maior produção de enzimas usando cultivo em estado sólido com aeração forçada em leito fixo, concluindo que esta técnica aumentou a produção de celulases por cultivo de *P. decumbens* (MO; ZHANG; LI, 2004). A Figura 11 demonstra os perfis de atividade de pH e lipase para este cultivo.

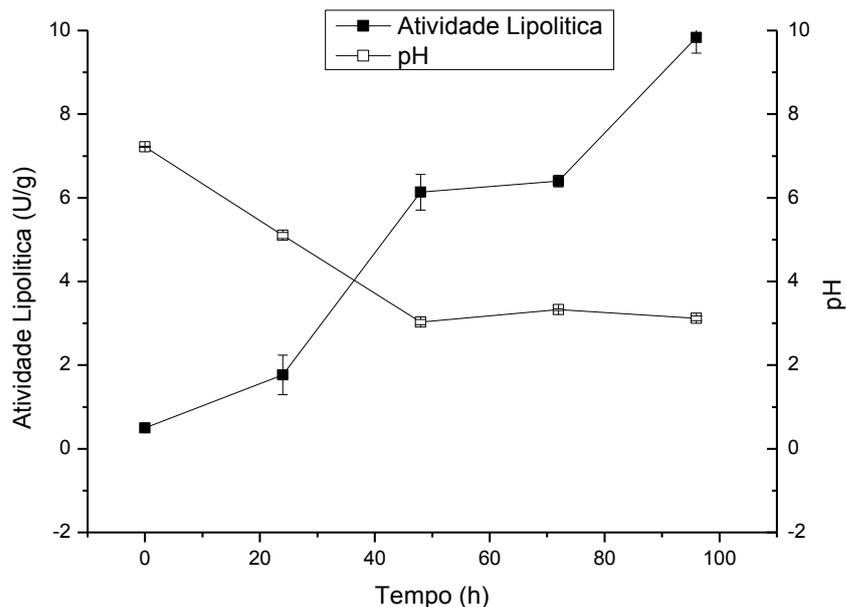


Figura 11 - Perfil de atividade de lipase e pH para aumento de escala com biorreator com leito fixo e passagem de ar no leito.

#### 4.3.2. Biorreator de tambor agitado em escala piloto

A atividade de lipase e os resultados de pH para o teste de produção de lipase em biorreator de tambor agitado são mostrados na Figura 12. Pode-se observar que o resultado para a atividade da lipase a 96 h ( $6,37 \pm 0,02 \text{ U.g}^{-1}$ ) foi menor do que os resultados encontrados para os outros tipos de biorreatores testados. O perfil de pH apresentou comportamento diferente do observado na validação e teste do biorreator aerado. Neste caso, o pH mais baixo foi de 4,85, não alcançando a mesma faixa de pH de 3,00-4,00 observada em outros cultivos. Após 48 h de cultivo, observou-se evolução de aromas de decomposição orgânica, na saída de ar, indicando uma possível contaminação no biorreator. Sabe-se que o bagaço de malte tem alto teor de umidade, valor nutricional e açúcares fermentáveis, sendo muito suscetível à contaminação microbiana (THIAGO; PEDRO; ELIANA, 2014). Além disso, a mistura mecânica do substrato foi realizada a cada 24 h durante 30 min para homogeneização e isso poderia prejudicar certas estruturas de fungos filamentosos. O mesmo autor afirma que a agitação intermitente poderia ser benéfica para o cultivo em casos com problemas elevados de adensamento do leito em reatores estáticos (MITCHELL et al., 2000; MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Ao simular essa escala piloto, percebeu-se que o

alto teor de umidade no bagaço pode ter favorecido um eventual contaminante já presente no bagaço desde a sua retirada da fábrica.

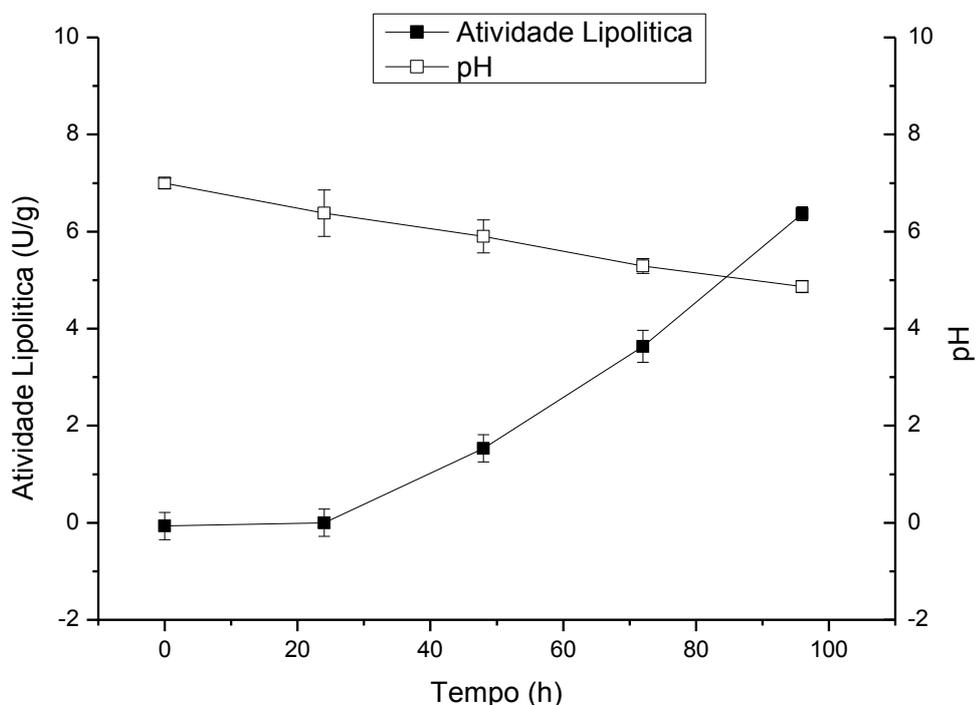


Figura 12 – Perfil de atividade de lipase e pH durante teste em escala piloto.

#### 4.4. PREPARADO ENZIMÁTICO SÓLIDO

Conforme já demonstrado, uma possível estratégia para redução de custos associados com a rota enzimática em produção do biodiesel, é o uso de um sólido fermentado, rico em lipase, produzido através de CES, para catálise de reações de esterificação e transesterificação (SALUM et al., 2010). Neste caso, não somente o substrato seria de baixo custo, no caso de resíduos agroindustriais, como também os custos de purificação e imobilização de lipases seriam reduzidos. De maneira semelhante, para avaliar o uso deste sólido enzimático, foi utilizado o cultivo de 96 h, com parâmetros otimizados, para realizar testes de transesterificação.

Após 18 h de reação de transesterificação, a análise de CG mostrou conversão de 2,15 % de ésteres etílicos. Embora a conversão da transesterificação tenha sido baixa, a atividade de lipase medida no PES ( $7,35 \pm 0,13 \text{ U.g}^{-1}$ ) foi uma atividade relativamente mais baixa que

encontrado nos cultivos de reatores de leito fixo com e sem aeração, mas levando em conta que o processo visa imobilizar as enzimas para reuso, pensa-se que, já que manteve resultados parecidos, pode se tornar uma alternativa interessante para uso como biocatalisador em mais testes. Em um trabalho semelhante, produzindo PES rico em lipase com *R. microsporus*, foi encontrado cerca de 17 % de conversão de biodiesel ao mesmo tempo (18 h), mas achou maior conversão em 72 h de reação, atingindo uma conversão de 68 % (ZAGO et al., 2014). Salum, et al. (2010), mostrou que o sólido fermentado produzido através de CES de *B. cepacia*, em uma mistura de bagaço de cana de açúcar e farinha de semente de girassol, foi capaz de catalisar transesterificação de óleo de soja, atingindo 95 % de conversão em 46 h de reação. A técnica de preparado enzimático sólido já foi relatada na literatura, para o tratamento de resíduos e para a produção de biodiesel, como "Sólido fermentado com atividade lipolítica", apresentando um bio-produto promissor para as indústrias (ROSA et al., 2006; ZAGO et al., 2014). Em testes de tratamento de efluentes com óleo e graxa, Rosa et al. (2006) conseguiram usar PES com atividade lipolítica ( $32,3 \text{ U.g}^{-1}$ ), produzido através de CES de *Penicillium restrictum* em resíduo da indústria de óleo de babaçu, conseguindo deixar o efluente em condições ambientalmente legais de descarte. O autor conclui que tais trabalhos representam uma contribuição importante como auxílio em tratamentos biológicos de efluentes com altos teores de óleo (ROSA et al., 2006).

## Capítulo 5 – Conclusões

Neste trabalho, a produção de lipase em cultivo em estado sólido de *Aspergillus brasiliensis* foi otimizada utilizando análise de DCC e o resultado foi validado com parâmetros ótimos de pH 7,71 (tampão fosfato 0,2M), 11,34% de óleo de soja a 32,74 °C, obtendo um valor máximo de atividade lipolítica de 8,17 U.g<sup>-1</sup>.

Além disso, as condições ótimas obtidas na análise estatística foram utilizadas para produzir lipase em diferentes tipos de biorreatores de estado sólido, obtendo maiores resultados de atividade de lipase extracelular em biorreator de leito fixo com aeração forçada, apresentando atividade de lipase de 9,83 U.g<sup>-1</sup>.

Os resultados obtidos em teste de reator em escala piloto foram relativamente mais baixos que os demais resultados encontrados para o mesmo tempo de cultivo dos outros reatores (96 h), com atividade lipolítica de 6,37 U.g<sup>-1</sup>. O resultado mais baixo, comparado com os valores de atividade de lipase encontrado nos cultivos em reator aerado e reator de bandeja, podem ser devido a contaminação ocorrida no reator em escala piloto.

Adicionalmente, foi realizado um Preparado Enzimático Sólido (PES) para avaliar a atividade da lipase e a conversão de óleo de soja a ésteres etílicos de lipídios, obtendo resultados de atividade de lipase comparável com os resultados dos cultivos em diferentes biorreatores, com 7,34 U.g<sup>-1</sup> e 2,15% de conversão de transesterificação em 18 h de reação. Embora a conversão de biodiesel tenha sido menor do que os trabalhos semelhantes na literatura, a reação não foi otimizada ou testada em tempo de reação mais longo, o que poderia melhorar as taxas de conversão.

## Capítulo 6 – Perspectivas

Apesar dos melhores resultados terem sido em 96 h de cultivo, não foram realizados cultivos em maiores períodos de tempo para saber se poderiam ser obtidos melhores resultados. Também, a otimização foi realizada em reatores de bandeja sem passagem de ar, mas os reatores de leito fixo com passagem forçada de ar se mostraram mais produtivos nas mesmas condições de cultivo. Desta forma, em trabalhos futuros, pode-se fazer uma otimização das condições em reatores de leito fixo de passagem forçada de ar, visto que as condições ótimas podem ser diferentes.

Analisando os resultados relativamente mais baixos em reator de escala piloto, uma das razões deste fato pode ter sido a possível contaminação, mais aparente a partir de 48 h de cultivo. Apesar de já ser esperado que ocorresse a contaminação, visto que não houve esterilização do bagaço, não se sabia ao certo qual seria a influência na atividade de lipase observada. Como não foi observada a presença de esporos pretos após 48 h de cultivo, como observado nos cultivos de validação e reatores cilíndricos de leito fixo com passagem de ar, imagina-se também que a baixa atividade pode estar relacionada a baixo crescimento celular de *Aspergillus brasiliensis*. Em trabalhos futuros, esse cultivo de escala piloto pode ser realizado sem adição suplementar de solução tampão ou água, já que baixos teores de umidade no substrato favorecem culturas como fungos filamentosos e não favorece culturas de bactérias e leveduras, evitando contaminação.

A produção de lipase no cultivo em estado sólido foi otimizada neste trabalho, mas estudos adicionais são necessários para otimizar a aplicação de lipase como PES em processos industriais, como conversão de biodiesel, biorremediação e tratamento de efluentes. De acordo com a literatura, os testes de transesterificação que foram realizados neste estudo foram superficiais, somente para fins de teste preliminar. O tempo de reação do teste de transesterificação foi baixo em comparação com outros trabalhos e o PES não foi testado como possível agente de recuperação de efluentes. Ambas as aplicações têm importância industrial e poderiam justificar novos trabalhos com o cultivo. Nota-se também que, apesar de parecerem baixos os resultados de atividade, pode ser possível o reuso desse material, podendo se tornar viável para processos industriais.

## REFERÊNCIAS

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. *Fuel*, v. 135, p. 315–321, 2014.

ALIYU, S.; BALA, M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 3, p. 324–331, 2013.

ASHOK, A. et al. Design of solid state bioreactor for industrial applications: An overview to conventional bioreactors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 9, n. October 2016, p. 11–18, 2017.

BARON, A. M.; TURRA, V. M. Z.; MITCHELL, D. A. Produção e caracterização de lipases de *Penicillium clorylphilum* IOC 4211. Recife, Brazil, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BROCCA, S. et al. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. p. 2312–2319, 2003.

BURKERT, J. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* using factorial design. *Bioresource Technology*, v. 91, n. 1, p. 77–84, jan. 2004.

CHAUHAN, M.; YENNAMALLI, R. M.; GARLAPATI, V. K. Biochemical characterization and molecular modeling of a unique lipase from *Staphylococcus arlettae* JPBW-1. *Engineering in Life Sciences*, v. 16, n. 8, p. 762–768, 2016.

CHOUDHURY, P.; BHUNIA, B. Industrial Application of Lipase: a Review. *Biopharm Journal*, v. 1, n. 2, p. 41–47, 2015.

COLLA, L. M. et al. Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. *BioMed Research International*, 2015.

CORDEIRO, L. G. Caracterização e Viabilidade Econômica do Bagaço de Malte Oriundo de Cervejarias para Fins Energéticos, dissertação de mestrado, Joao Pessoa - PB, Brasil, 2011.

CYNDY, M. F. et al. High-level lipase production by *Aspergillus candidus* URM 5611 under solid state fermentation (SSF) using waste from *Siagrus coronata* (Martius) Becari.

African Journal of Biotechnology, v. 14, n. 9, p. 820–828, 2015.

DA SILVA MENEZES, B.; ROSSI, D. M.; AYUB, M. A. Z. Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 3, p. 0, 2017.

DAIHA, K. D. G.; ANGELI, R.; OLIVEIRA, S. D. DE. Are Lipases Still Important Biocatalysts ? A Study of Scientific Publications and Patents for Technological Forecasting. p. 1–20, 2015.

DE CASTRO, S. M.; DE CASTRO, A. M. Assessment of the Brazilian potential for the production of enzymes for biofuels from agroindustrial materials. *Biomass Conversion and Biorefinery*, v. 2, n. 1, p. 87–107, 2012.

DUTRA, J. C. V; TERZI, S. C. Lipase Production in Solid-State Fermentation Monitoring Biomass Growth of *Aspergillus niger* Using Digital Image Processing. p. 63–75, 2008.

EDWINOLIVER, N. G. et al. Scale up of a novel tri-substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 17, p. 6791–6796, 2010.

EICHLER, P. et al. Biomethanol production via gasification of lignocellulosic biomass. *Química Nova*, v. 38, n. 6, p. 828–835, 2015.

FALONY, G. et al. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, v. 44, n. 2, p. 235–240, 2006.

FERRAREZI, A. L. et al. Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic *Thermomucor indicae seudaticae* N31 for transesterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 107, p. 106–113, 2014.

GALPERIN, M. Y.; COCHRANE, G. R. Nucleic Acids Research annual Database Issue and the NAR online Molecular Biology Database Collection in 2009. *Nucleic Acids Research*, v. 37, n. Database issue, p. D1–D4, 2009.

GANJALIKHANY, M. R. et al. Functional Motions of *Candida antarctica* Lipase B : A Survey through Open-Close Conformations. v. 7, n. 7, 2012.

GOPINATH, S. C. B. et al. Strategies to Characterize Fungal Lipases for Applications in Medicine and Dairy Industry. v. 2013, p. 31–34, 2013.

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.

GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 68, n. 1, p. 1–21, 2011.

GUPTA, R. P. Bench-Scale Development of Fluidized-Bed Spray-Dried Sorbents. 1993.

GURUNG, N. et al. A Broader View : Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries , Medicine , and Beyond enzyme and its use were well known to the mankind. 2013.

GUTARRA, M. L. E. et al. Lipase production and *Penicillium simplicissimum* morphology in solid-state and submerged fermentations. *Biotechnology Journal*, v. 4, n. 10, p. 1450–1459, 2009.

HASAN, F. et al. Enzymes used in detergents: Lipases. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 31, p. 4836–4844, 2010.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

HE, Y. Q.; TAN, T. W. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 43, n. 1–4, p. 9–14, 2006.

HORWITZ. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 12th edition. edited by William Horwitz. Association of official analytical chemists, p.o. box 540, Benjamin Franklin station, Washington, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 65, n. 1, p. 162, 1975.

KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry*, v. 33, n. 5, p. 505–511, 1998.

KAUSHIK, R. et al. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 40, n. 3–4, p. 121–126, 2006.

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. 2, p. 119–125, 2008.

LIU, D. et al. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 65, n. 5, p. 717–725, 2011.

MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 5, p. 715–721, 2002.

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, n. 6, p. 1729–1735, 2008.

MARCUSSO, E. F.; MULLER, C. V. A CERVEJA NO BRASIL : O ministério da agricultura informando e esclarecendo. 2012.

MELLO, L. R. P. F.; MALI, S. Use of malt bagasse to produce biodegradable baked foams made from cassava starch. *Industrial Crops and Products*, v. 55, p. 187–193, 2014.

MENONCIN, S. et al. Study of the Extraction , Concentration , and Partial Characterization of Lipases Obtained from *Penicillium verrucosum* using Solid-State Fermentation of Soybean Bran. p. 537–544, 2010.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959.

MITCHELL, D. A. et al. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 10, p. 1211–1225, 2000.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. *Solid State Fermentation Bioreactors*, 2006.

MO, H.; ZHANG, X.; LI, Z. Control of gas phase for enhanced cellulase production by *Penicillium decumbens* in solid-state culture. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 10, p. 1293–1297, 2004.

MOHAN, S. V. et al. Waste Biorefinery: A New Paradigm for a Sustainable Bioelectro Economy. *Trends in Biotechnology*, v. 34, n. 11, p. 852–855, 2016.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, v. 43, n. 1, p. 1–14, 2006.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 27, n. 2, p. 109–117, 1992.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, n. 2–3, p. 81–84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 10, p. 1153–1169, 2000.

REKHA, K. S. S. et al. Production and Optimization of Lipase From *Candida Rugosa* Using Groundnut Oilcake Under Solid State. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, v. 1, n. 4, p. 571–577, 2012.

RESEARCH, G. V. Grand View Research Inc. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-enzymes-market>, 2016. Acessado em 11 de Abril de 2018.

RIBEIRO, B. D. et al. Production and Use of Lipases in Bioenergy : A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production, 2011.

ROBLES-MEDINA, A, GONZÁLEZ-MORENO, P.A., ESTEBAN-CERDÁN, L., MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis : Towards ever greener biodiesel production. v. 27, p. 398–408, 2009.

ROSA, D. R. et al. Preparation Produced by *Penicillium restrictum* in Activated Oil and Grease. v. 23, n. 5, p. 814–823, 2006.

RUTSATZ, M. D. Cultivo em estado sólido : modelagem e quantificação de biomassa em biorreator cilíndrico horizontal agitado, dissertação de Mestrado, Porto Alegre – RS, Brasil, 2006.

SALUM, T. F. C. et al. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. *Process Biochemistry*, v. 45, n. 8, p. 1348–1354, 2010.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SANTOS, F.; COLODETTE, J.; QUEIROZ, J. H. Bioenergia e Biorrefinaria: Cana-de-Açúcar e Espécies Florestais. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 551, 2013.

SCHMIDELL, W. et al. *Biotechnology Industrial Vol 2.*, Editora Edgar Blucher LTDS, 2001.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. DE. *Análise de alimentos : metodos quimicos e biologicos*. Viçosa: UFV, 2002.

SINGH, M. K. et al. Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 110, p. 92–99, 2014.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.

SIRÓ, I.; PLACKETT, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose*, v. 17, n. 3, p. 459–494, jun. 2010.

SOARES, D. et al. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 81, p. 15–23, 2013.

SOCCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, p. 1–20, 2017.

TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 5, p. 628–634, 2010.

TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Solid-state fermentation of brewer's spent grain for xylanolytic enzymes production by *Penicillium janczewskii* and analyses of the fermented substrate. *Bioscience Journal*, v. 31, n. 6, p. 1826–1836, 2015.

THIAGO, R. DOS S. M.; PEDRO, P. M. DE M.; ELIANA, F. C. S. Solid wastes in brewing process: A review. *Journal of Brewing and Distilling*, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2014.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 81, p. 146–161, dez. 2013.

TOSCANO, L. et al. A & EB lipase production through solid-state fermentation using agro-industrial residues as substrates and newly isolated. p. 28–31, 2012.

TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, v. 3, n. 2, p. 182–196, 2010.

VENKATA RAO, P.; JAYARAMAN, K.; LAKSHMANAN, C. M. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation. 1: determination of significant process variables. *Process Biochemistry*, v. 28, n. 6, p. 385–389, 1993.

WOLSKI, E. et al. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: A comparative study. *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, n. 9, p. 1557–1560, 2009.

WOOD, B. J. *Microbiology of Fermented Foods*. Springer US, 2012.

XIAO, B.; SUN, X. F.; SUN, R. C. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polymer Degradation and Stability*, v. 74, n. 2, p. 307–319, 2001.

XIROS, C.; CHRISTAKOPOULOS, P. Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system. *Biotechnology for Biofuels*, v. 2, p. 1–12, 2009.

ZAGO, E. et al. Synthesis of ethylic esters for biodiesel purposes using lipases naturally immobilized in a fermented solid produced using *Rhizopus microsporus*. *Energy and Fuels*, v. 28, n. 8, p. 5197–5203, 2014.

## Capítulo 7 – Apêndice

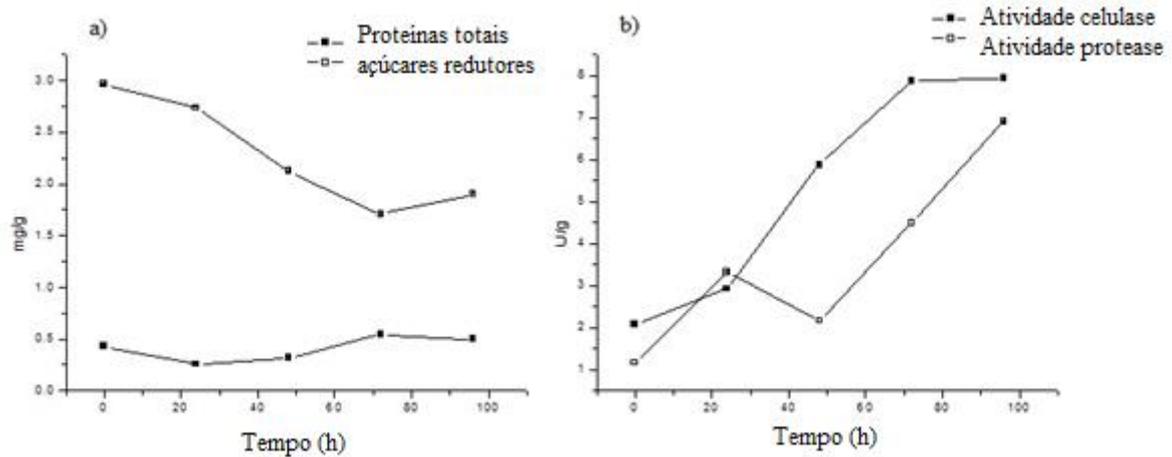


Figura 13 - Perfis para (a) proteínas solúveis e açúcares redutores e (b) atividade de celulase e protease para o cultivo de validação.

Para melhor avaliar o cultivo da validação do modelo ótimo de cultivo, resultados de proteínas totais, açúcares redutores, atividade de celulase e atividade de protease foram coletados e analisados. Os perfis de proteínas solúveis e açúcares redutores apresentaram comportamento que já era esperado. O microrganismo usa-se dos açúcares disponíveis para seu metabolismo, em um primeiro momento do cultivo, fazendo que o teor de açúcares diminuía nas primeiras horas de cultivo. A partir de um certo ponto, as enzimas presentes no cultivo, como celulasas, cumprem o papel de liberação de açúcares fermentescíveis no meio, aumentando os teores de açúcares redutores. Isso também pode ser comprovado pelo aumento de proteínas totais, visto no mesmo momento em que os açúcares redutores aumentaram. Outro comportamento já esperado era o crescimento de atividade de celulase e protease com o aumento do cultivo. Como o substrato é rico em celulose e não havia suplementação do meio de cultivo, era esperado que houvesse maior produção de celulase a medida que aumentasse o tempo de cultivo.