

## PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS PELO FUNGO ENDOFÍTICO

*Penicillium sp.* ISOLADO DAS FOLHAS DE *Ricinus communis L.*<sup>1</sup>

Maria Luiza Fernandes Rodrigues<sup>2</sup>, Edson Antonio da Silva<sup>2</sup>, Carlos Eduardo Borba<sup>2</sup>, Anne Caroline Defranceschi Oliveira<sup>3</sup>, Cíntia Kruger<sup>4</sup>, Rafaella Wandscheer Raimundo<sup>5</sup>, Leonardo Pefranjo Silva<sup>5</sup>, Monique Luiza Fernandes Rodrigues<sup>5</sup>, Bruna Thais Stuani<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Aceito para publicação no 2º Trimestre de 2015

<sup>2</sup>Prof. Dr. da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Toledo, PR), mlfmfernandes@hotmail.com, edsondeq@hotmail.com, borba\_deq@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Doutoranda da Universidade Federal do Paraná (Curitiba-PR), annewcaroline@hotmail.com

<sup>4</sup>Mestranda do Programa de Bioenergida da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Toledo, PR), cintia.kruger@hotmail.com

<sup>5</sup>Acadêmicos do Curso de Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Toledo, PR), rafaella\_wandscreer@hotmail.com, lpedranjo@gmail.com, monique\_gabriely94@hotmail.com, brunatstuani@hotmail.com

### Resumo

A aplicação de lipases fúngicas, produzidas por Fermentação no Estado Sólido (FES), nos processos industriais tem despertado interesse, por ser um processo relativamente fácil, de baixo custo e fácil obtenção e purificação do produto. Neste trabalho foram isolados os fungos endofíticos das folhas da mamona (*Ricinus communis L.*, *Euphorbiaceae*). Os fungos endofíticos foram inicialmente inoculados em meio Ágar batata dextrose (BDA) contendo o antibiótico cloranfenicol (250 mg/L) e incubados a 28°C por 15 dias. Através de cultivo em meio BDA, contendo rodamina B, óleo de oliva e sais minerais, foi selecionada a linhagem produtora de lipase, sendo identificada como *Penicillium sp.*, e mantida em meio sólido de Ágar BDA. Foi realizada a produção de lipases fúngicas por FES, utilizando-se

como substratos, as sementes com alto valor lipídico, como gergelim (*Sesamum indicum*), girassol (*Helianthus annuus*) e linhaça (*Linum usitatissimum L.*). Para a FES, foi utilizado o meio BDA contendo cloranfenicol em erlenmeyer. A FES foi realizada a 27°C, em 60 % de umidade e 10 g de substrato. Foi determinada a atividade lipolítica através de testes analíticos, avaliando-se a melhor condição de produção de lipases. A produção máxima da enzima foi de 16 U/gSS ou 160 U para o substrato semente de girassol em 96 horas de fermentação, com 60 % de umidade. Os resultados obtidos demonstraram que o processo da FES é viável para a produção da lipase e que estes biocatalisadores são capazes de realizar a hidrólise de óleos e gorduras, para um posterior emprego na síntese de biodiesel.

**Palavras-chave:** lipases, *Penicillium sp.*, FES.

## HYDROLYTIC ENZYMES PRODUCTION BY THE ENDOPHYTIC FUNGUS

*Penicillium sp.* ISOLATED FROM THE SHEETS OF *Ricinus communis L.*

### Abstract

The application of fungal lipases produced by solid state fermentation (SSF) on industrial processes has aroused interest by being a relatively easy, inexpensive and from easy product obtaining and purification process. At this present work, the endophytic fungus were isolated from the sheets of castor beans (*Ricinus communis L.*, *Euphorbiaceae*). The endophytic fungus were initially inoculated in Potato Dextrose Agar (PDA), containing the antibiotic chloramphenicol (250 mg/L) and incubated at 28°C for 15 days. Through the culture in PDA, with rhodamine B, olive oil and mineral salts, was selected the lipase production strain indentified as *Penicillium sp.*, and kept in solid agar PDA. Fungal lipase production was performed by SSF, using as substrates, high lipid content seeds like sesame (*Sesamum indicum*), sunflower (*Helianthus annuus*) and linseed (*Linum usitatissimum L.*) For the SSF, were added in an erlemeyer, PDA containing chloramphenicol. The SSF was held at 27°C, in 60% of humidity and with 10g of substrate. The lipase activity was determined through analytical tests evaluating the best conditions for lipase production. The maximum enzyme production was 16U/gSS or 160U for the sunflower seed substrate in 96h of fermentation, with 60% of humidity. The results show that SSF process is viable for lipase production and that these biocatalysts are able to perform oils and fat hydrolysis, for later use in biodiesel synthesis.

**Keywords:** lipases, *Penicillium sp.*, SSF.

## **Introdução**

Nas indústrias, o uso enzimático e de biocatálise têm sido muito eficiente no desenvolvimento de processos tecnológicos, sendo que a maioria destas é produzida por micro-organismos através de processos fermentativos.

Contudo, para utilização de processos enzimáticos, os custos são elevados para indústria, tendo em vista que exige sua produção e recuperação do biocatalisador do meio de fermentação. Os resíduos gerados pelas indústrias aumentam cada vez mais, assim a preocupação em buscar uma utilização para este resíduo é inevitável (POLONIO *et al.*, 2014).

Existem dois tipos básicos de fermentação para produção de enzimas e outros metabólitos: fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES). No caso da FS, os substratos são dissolvidos em meio líquido e na FES, o micro-organismo pode crescer entre os fragmentos do substrato ou sobre a superfície do substrato, consumindo o substrato e secretando metabólitos e enzimas (OLIVEIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Tentando amenizar os gastos, uma das formas de se obter enzimas é pelo método de FES, pois usa como substratos resíduos agroindustriais, que são de baixo custo, e o biocatalisador pode ser produzido na forma concentrada para facilitar a sua recuperação (RAMOS-SÁNCHEZ *et al.*, 2015).

As lipases são enzimas originárias de um grande número de bactérias, fungos, plantas e animais, tendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência (CASTRO *et al.*, 2004). Economicamente e industrialmente, as lipases são as mais utilizadas, devido a sua relativa facilidade de produção; enantiosseletividade e regioseletividade; abundância de micro-organismos capazes de sintetizá-las; por serem estáveis em solventes orgânicos e não necessitarem de cofatores (JAEGER & REETZ, 1998).

O interesse industrial pela lipase se deve ao fato dela possuir vasta aplicação em diferentes áreas (ATTAR & AMINIFAR, 2014), como por exemplo: detergentes (SAISUBRAMANIAN *et al.*, 2006), medicamentos (HASAN *et al.*, 2006), biodiesel (PARK *et al.*, 2006) e efluentes (CASTRO *et al.*, 2005), dentre outros.

Com isso, este trabalho tem como objetivo realizar o isolamento e “screening” de fungos endofíticos isolados de folhas de mamona (*Ricinus communis L., Euphorbiaceae*) para a produção de lipases por Fermentação em Estado Sólido, usufruindo de substratos baratos, para aplicação em reações de hidrólise de triacilgliceróis.

## **Materiais e métodos**

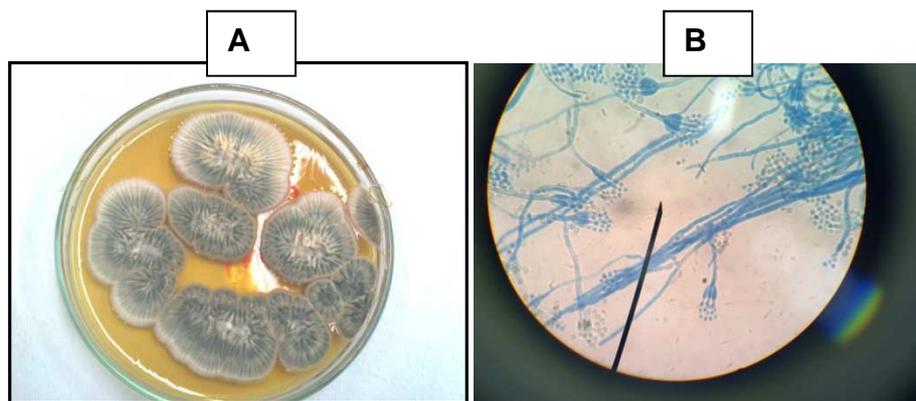
O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade Estadual do Oeste do Paraná- Unioeste, no Centro de Engenharia e Ciências Exatas – Campus Toledo.

### *Isolamento de micro-organismos*

O material botânico das folhas de mamona (*Ricinus communis L., Euphorbiaceae*) foi coletado no município de Curitiba, PR. Foram selecionadas as folhas saudáveis das plantas adultas. Em seguida realizou-se o tratamento de desinfestação das folhas na seguinte sequência: 1) primeiramente colocou-se parafina nas pontas dos pecíolos das folhas; 2) os explantes foram lavados em água corrente; 3) em seguida, foram imersos em um recipiente contendo água esterilizada por 1 minuto; 4) álcool 70% por um minuto; 5) Hipoclorito por 4 minutos; 6) Em seguida, ao álcool 70% novamente por 30 segundos; 7) e por fim, foram lavados em água esterilizada duas vezes, separadamente, um minuto em cada. Após o tratamento de desinfestação, as folhas foram cortadas em fragmentos de 6 mm, transferidas para o meio de cultura Batata Dextose Ágar acrescido de cloranfenicol e incubadas a  $25\pm 2$  °C. O crescimento foi acompanhado diariamente e esporos de colônias distintas foram inoculados em tubos de ensaio com BDA inclinado, isolando os exemplares (SOUZA *et al.*, 2004).

A identificação das linhagens fúngicas foi realizada por microcultivo, pela comparação morfológica baseada em literatura especializada. Os fungos isolados foram incubados por sete dias, que posteriormente foram congelados para sua conservação.

Foram isolados 50 linhagens fúngicas das folhas de mamona. O micro-organismo utilizado neste trabalho (Figura 1A e 1B) foi o fungo endofítico *Penicillium sp.* isolado das folhas de mamona (*Ricinus communis L., Euphorbiaceae*), isolado no laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.



**Figura 1.** A- Imagem do fungo *Penicillium sp.* em meio Ágar BDA-clorofenicol. B- Imagem da microscopia óptica do fungo *Penicillium sp.*

#### *Esterilização de meios e equipamentos*

Para garantir condições estéreis de crescimento dos micro-organismos, os meios sólidos de propagação, do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 min.

#### *Estoques e manutenção das cepas*

As cepas foram inoculadas em meio BDA e incubadas por 7 dias a 28°C, fazendo-se repiques mensais, sendo após o crescimento mantidas sob refrigeração (4°C).

#### *Seleção da linhagem com atividade lipolítica*

Para verificar se a linhagem fúngica de *Penicillium sp.* produzia lipase, foram realizados testes em placas de Petri com meio ágar Bacteriológico contendo o corante Rodamina B 0,001%, óleo de oliva 1% como única fonte de carbono, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4 g/L; extrato de levedura 2,0 g/L e Tween 80 0,01% (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A produção de lipase em placas de Petri foi confirmada pela presença de halos alaranjados (Figura 2), fosforescentes ao UV quando observado ao ultravioleta a 350 nm, após 72 h de incubação em estufa a 27°C. As linhagens produtoras de lipases foram mantidas em meio sólido de ágar Rose com repiques mensais e também em estoque em óleo mineral.

#### *Produção de protease, amilase e celulase*

Primeiramente foi preparado o Meio base ( $\text{MgSO}_4$  0,2 g.L<sup>-1</sup>; NaCl 0,1g.L<sup>-1</sup>; Extrato de Leveduras 0,4g.L<sup>-1</sup>;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4g.L<sup>-1</sup>;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1 g.L<sup>-1</sup>), na qual foi adicionado Ágar Bacteriológico. Para cada experimento, foram adicionadas, separadamente, ao meio base, diferentes fontes de carbono. Para a o meio da protease, foi adicionado 2% do volume de leite em pó desnatado (OLIVEIRA *et al.*, 2012), para amilase 1% de amido (OLIVEIRA *et al.*, 2011), celulase 1% de carboximetilcelulose. Após o preparo dos meios, três deles foram autoclavados por 15 minutos a 121° C. Somente o meio da protease, foi aquecido em chapa, para não promover a desnaturação das proteínas do leite. Em seguida, foi inoculado o fungo em placas de Petri, em 4 pontos da placa, e incubadas por 72 h a 27°C.

A presença dos halos foi verificada pelo uso de soluções reveladoras. O meio protease foi revelado com a solução de ácido acético 5% para observar a formação de halos transparentes. Para a produção de amilase, a revelação foi feita com solução lugol, e em celulase, a revelação foi feita com solução de vermelho congo 1% (OLIVEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

#### *Fermentação no estado sólido*

##### *Preparação dos Substratos*

Nestes estudos foram utilizados como substratos as sementes de gergelim (*Sesamum indicum*), de girassol (*Helianthus annuus*) e de linhaça (*Linum usitatissimum L.*), que possuem alto valor lipídico.

Estes substratos foram utilizados separadamente na FES para a produção de lipases, os quais, ainda frescos, foram moídos, tamisados e embalados em embalagens plásticas, sendo utilizadas as frações dos substratos com granulometria de 0,8 e 2,0 mm (dimensões da tamisa) de diâmetro para os estudos de FES.

##### *Composição Físico-Química dos Substratos*

A composição centesimal dos resíduos, como umidade, cinzas e teor de óleo foi determinada no Laboratório de Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

##### *Determinação do teor de Umidade*

O teor de umidade foi determinado de acordo com o método descrito conforme Zenebon *et. al* (2008). As amostras foram trituradas até a formação de um pó fino. Em seguida, suas massas (aproximadamente 1 g) foram pesadas em cadinhos, previamente pesados e tratados em mufla a 650°C, utilizando balança analítica. Após a pesagem o mesmo foi colocado em estufa à temperatura de 110°C por 1 hora. Depois de arrefecidas à temperatura ambiente em dessecador, foram submetidas à nova pesagem até a obtenção do peso constante. Essas medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra.

#### *Determinação do teor de Cinzas*

A determinação quantitativa das cinzas totais foi realizada também de acordo com o método descrito por Zenebon *et. al* (2008). Para isso, foram pesados aproximadamente 1 g dos substratos, transferidos para cadinhos de porcelana previamente calcinados, arrefecidos e pesados. Após a distribuição uniforme das amostras nos cadinhos, as mesmas foram incineradas na temperatura de 700°C por 3 horas. Após esta etapa foram calculadas as percentagens de cinzas em relação ao substrato que foi submetido ao processo de secagem. Essas medidas, também, foram realizadas em duas repetições para cada amostra.

#### *Determinação do teor de Óleo*

Para a determinação do teor de óleo foi utilizado o método de Soxhlet, onde a amostra foi pesada em balança analítica e transferida para um cartucho que foi tampado com algodão. O cartucho foi colocado em um extrator, que foi encaixado em um balão volumétrico. Sobre o cartucho, foi vertido o hexano, responsável pela extração dos óleos. O condensador foi conectado e a manta de aquecimento foi ligada. O tempo necessário para este método foi de 6 horas após o início da ebulição. Após a amostra foi secada com a evaporação do solvente e novamente pesada (Zenebon *et. al*, 2008).

#### *Otimização da produção de lipases*

Para avaliar a produção da enzima, os substratos foram fermentados isolados (sementes de gergelim, girassol e linhaça).

#### *Condições de Cultivo no Meio Sólido*

Os ensaios de FES foram realizados conforme metodologia descrita por Fernandes *et al.*, (2007). Para a preparação do inóculo foram utilizados frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo o meio Ágar BDA – cloranfenicol. O fungo foi incubado em estufa a 27°C por sete dias. Após o crescimento foi feita a maceração do meio através de pedras de porcelana e adicionou-se água estéril no material e solubilizado.

Para a FES foram utilizados Erlenmeyers de 250 mL, contendo, separadamente, 10 g de cada substrato de gergelim, girassol e linhaça, com um teor de umidade de 60 %, utilizando-se tampão fosfato pH 7,0 (50 mM). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após o preparo, os substratos foram inoculados assepticamente com o inóculo, mantendo-se uma quantidade final no meio sólido de aproximadamente 1,0 mL. Em seguida, os sólidos foram incubados em estufa a 27°C durante 24, 48, 72, 96 e 120 h.

A produção de lipase foi acompanhada pela dosagem da atividade lipolítica (método titulométrico) no material fermentado. A atividade lipolítica foi expressa como unidades de atividade enzimática por grama de sólido fermentado (U/gSS).

#### *Secagem do Sólido Fermentado*

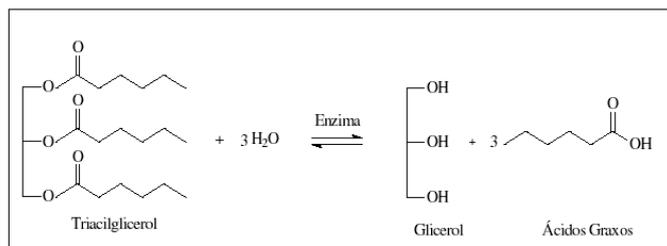
Os sólidos fermentados foram congelados a 0 °C por 24 h para interromper o crescimento fúngico. Após esse período, foram secos em liofilizador (liofilizador Jouan LP3® modelo 60, - 46°C) e acondicionados em embalagens plásticas, os quais foram armazenados em temperatura ambiente.

#### *Métodos analíticos*

##### *Método Titulométrico*

Os ensaios de atividade frente à triacilgliceróis foram realizados utilizando-se o óleo de oliva (La Violetera). como substrato. A determinação da atividade de lipases por titulometria foi baseada no método proposto por Stuer *et al.* (1986), com modificações.

O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis (Figura 2).



**Figura 2.** Reação de hidrólise do triacilglicerol catalisada por lipases.

O meio reacional para o substrato foi previamente preparado na forma de emulsão. A emulsão é composta por solução tampão fosfato 50 mM pH 7,0, goma arábica 10 % e pelo substrato óleo de oliva (1,0 mM). Os ácidos graxos liberados do substrato emulsificado pela ação da enzima foi titulado com NaOH 0,05 M, a 37°C e pH 7,0 por 5 min. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a liberação de 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio.

## Resultados e discussão

### *Composição físico-química dos substratos*

Foram empregados os seguintes substratos: farelo de semente de girassol (FSG), farelo de semente de linhaça (FSL), farelo de semente de gergelim (FSGE), preparados no laboratório. Os substratos foram fornecidos pelo Mercado Municipal (Curitiba, PR).

A Tabela 1 apresenta os resultados da composição físico-química dos substratos descritos acima. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Como pode ser observado na Tabela 1, o FSGE possui um maior teor de lipídeos (48 %) em relação ao FSL (28 %) e ao FSG (32 %). Estes resultados estão de acordo com a origem e o tipo de processamento que estes materiais sofreram antes de serem utilizados como substratos.

**Tabela 1.** Composição físico-química dos substratos utilizados para produção de lipases fúngicas.

Substrato	Lipídeos %	Umidade %	Cinzas%
FSG	32,4	0	7,0
FSL	28,4	0,24	7,0
FSGE	48,1	0,04	0

**Legenda:** farelo de semente de girassol (FSG); farelo de semente de linhaça (FSL); farelo de semente de gergelim (FSGE).

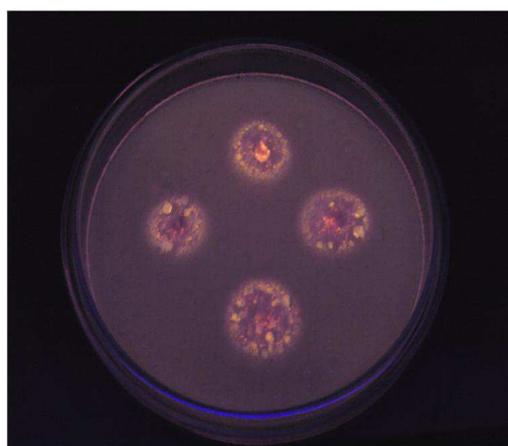
Com relação ao teor de lipídeos, os dados obtidos neste trabalho estão semelhantes aos descritos na literatura. Para o gergelim, o teor de lipídeos varia de 44-58% (QUEIROGA *et al.*, 2010); girassol entre 25 – 30% (CARRÃO-PANIZZI & MANDARINO, 2005) e linhaça de 32-41% (CUPERSMID *et al.*, 2012).

#### *Produção de enzimas por fungos endofíticos da mamona*

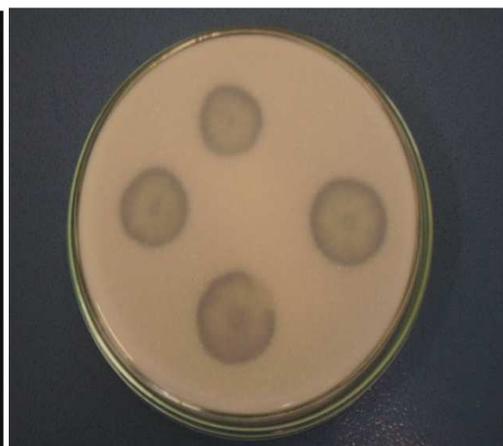
Para o experimento de *Screening* de micro-organismos produtores de enzimas, foram testadas as produções de lipases, proteases e amilases da linhagem de *Penicillium sp.* isoladas da planta.

Verificou-se que a *linhagem fúngica* isolada neste trabalho foi boa produtora de enzimas, com interesse industrial.

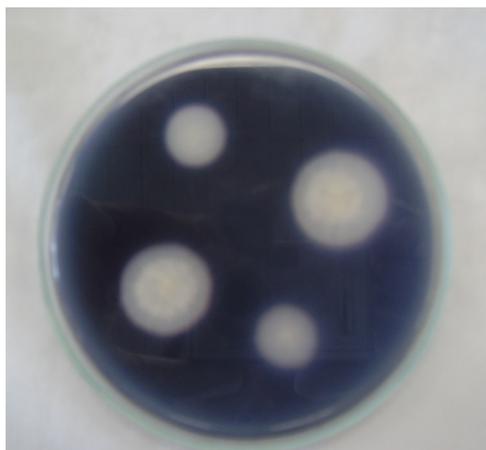
Os resultados são apresentados nas Figuras abaixo.



**Figura 2-** Imagem da produção de lipase.



**Figura 3-** Imagem da produção de protease.



**Figura 4-** Imagem da produção de amilase.

**Fontes das Figuras:** Oliveira e Rodrigues (2014).

Apesar das enzimas industriais de origem microbiana serem produzidas, principalmente por fermentação submersa (FSm), a fermentação no estado sólido (FES) representa um método tradicional e favorável em alguns países. Dentre os fungos filamentosos, as três classes mais usadas em FES são Phycomycetes (*Mucor e Rhizopus*), Ascomycetes (*Aspergillus e Penicillium*) e Basidiomycetes (*Polysporus*) (PANDEY, 1999).

O uso de enzimas como catalisadores de processos industriais é de fundamental importância para a obtenção de produtos de alta qualidade e de maior valor agregado por tecnologias limpas, e em sintonia com as necessidades tecnológicas, de mercado e de preservação ambiental.

As lipases (triacilglicerol éster hidrolase, E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que "in vivo" catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, sendo a trioleína o seu substrato padrão, aos ácidos graxos correspondentes e glicerol, constituindo uma classe especial de carboxil éster hidrolases (DIAZ *et al.*, 2006; JAEGER & EGGERT, 2002). São utilizadas na indústria para resolução de misturas racêmicas; na formulação de detergentes e síntese de biosurfactantes; no tratamento de efluentes; na indústria oleoquímica (bioconversão de óleos e gorduras) para a produção de biodiesel; na indústria agroquímica; na manufatura do couro e papel; na nutrição; na produção de aromas; na formulação de perfumes, fragrâncias e cosméticos; na fabricação de plásticos e fibras sintéticas; na síntese de sedativos e outros fármacos; dentre outras (CAMMAROTA & FREIRE, 2006; JAEGER & EGGERT, 2002; KIRK *et al.*, 2002).

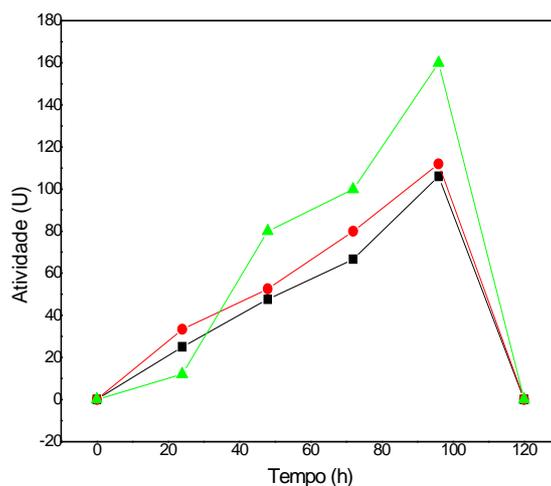
As proteases são enzimas capazes de clivar as ligações peptídicas de proteínas e peptídeos. São classificadas como classe 3 das enzimas, as hidrolases, e sua subclasse é a (EC 3.4) das hidrolases que rompem as ligações peptídicas, sendo enzimas amplamente aplicadas industrialmente na degradação de proteínas e também na síntese de peptídeos (PILLAI *et al.*, 2011).

A  $\alpha$ -amilase (1,4- $\alpha$ -glucan-4-glucanohidrolase, EC 3.2.1.1.) pode ser definida como sendo enzima que quebra as ligações  $\alpha$ -1,4 dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glucose em união  $\alpha$ -1,4. Por se tratar de uma endoenzima, o ataque ocorre aleatoriamente sobre vários pontos da cadeia, sendo os primeiros produtos da hidrólise oligossacarídeos com 5 a 7 unidades de glucose (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As amilases são aplicadas nos mais variados ramos industriais que necessitam da hidrólise do amido, sendo principalmente utilizadas na indústria alimentícia para preparação de cervejas, geléias e obtenção de glucose livre para as mais variadas aplicações. Além da indústria de alimentos, estas enzimas podem ser utilizadas na formulação de detergentes e nas indústrias de papel, farmacêutica, fermentação e têxtil (OLIVEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

#### *Produção de lipases de Penicillium sp. por FES*

Para a otimização da produção da enzima, foi analisado o melhor substrato, e estes foram fermentados de maneira isolada: farelo de semente de gergelim (FSGE), farelo de semente de girassol (FSG) e farelo de semente de linhaça (FSL). Outra variante que foi avaliada neste estudo foi o tempo de produção da enzima, sendo a fermentação conduzida em condições idênticas por 120 horas, sendo retiradas amostras a cada 24 horas, para observar o pico máximo de produção conforme ilustrado na Figura 5.



**Figura 5-** Produção de lipase por *Penicillium* sp. em função do tempo de fermentação e do tipo de substrato: (-△-) girassol; (-●-) gergelim; (-■-) linhaça. A umidade do substrato foi de 60 %.

Como observado na Figura acima, *em todos os substratos* ocorreu a produção da enzima variando-se a concentração conforme o substrato empregado.

Os substratos semente de gergelim, linhaça e girassol apresentaram alto teor lipídico, sendo esperada uma boa produção em todos eles. O pico máximo de produção de lipases ocorreu em 96 horas. A produção máxima da enzima foi de 16 U/gSS ou 160 U para o substrato semente de girassol em 96 horas de fermentação, com 60 % de umidade.

Foram realizados experimentos para verificar a estabilidade da enzima à temperatura de 4 °C (geladeira). A enzima foi mantida na geladeira por 6 meses. A enzima mostrou-se estável, apresentando uma atividade de 125 U para o FSG; 102 U para o FGE e 92 U para o FSL, após 96 horas de fermentação. A enzima foi estável a baixas temperaturas por um período de 6 meses. Conservou 70 % da sua atividade para o FSG; 91 % para o FSGE e 96 % para FSL, possibilitando o uso destas enzimas em aplicações industriais.

Diversos substratos têm sido utilizados na produção de lipases por FES. Segundo a literatura, são utilizados substratos tais como o farelo de trigo, arroz e semente de soja, torta de girassol e de amêndoa, fibra de dendê, dentre outros.

Comparando-se os resultados aqui obtidos, verifica-se que os resultados deste trabalho foram superiores a maioria dos reportados na literatura.

Ul-Haq *et al.* (2002) realizaram estudos sobre a produção de lipases fúngicas de *Rhizopus oligosporous* em FES, sem adição de indutores. Eles estudaram diferentes resíduos agroindustriais, tais como o farelo de trigo, arroz e semente de soja, torta de girassol e de amêndoa. Eles verificaram a produção máxima de enzima (48 U/gSS) com a torta de amêndoa, após 72 h de fermentação.

A fibra de dendê também foi utilizada como substrato para produção de lipases por FES pelo fungo *Aspergillus niger*. Os autores obtiveram uma produção máxima em 72 h de cultivo (58,27 U/mg de proteínas totais) (SILVEIRA, 2014).

Cordova *et al.* (1998) também pesquisaram a produção de lipases fúngicas por FES, com os micro-organismos *Rhizomucor pusillus* e *R. rhizopodiformis*, utilizando-se a torta da extração do óleo de oliva e o bagaço de cana-de-açúcar como substratos. Eles verificaram que a produção máxima de lipase de *R. pusillus* (5,0 U/gSS) e *R. rhizopodiformis* (2,7 U/gss) foram obtidas com o bagaço de cana-de-açúcar.

Rodriguez *et al.* (2006) realizaram a FES para a produção de lipases. Eles suplementaram o bagaço de cana com diferentes tipos de óleo (oliva, milho e girassol) e obtiveram atividades lipolíticas muito parecidas (596, 504 e 493 U/gSS, respectivamente), para todos os indutores testados com *Rhizopus homothallicus*. Com o micro-organismo *Thermus thermophilus* HB27, a produção de lipases aumentou em 40% em relação ao controle (372, 2 U/mL) com a adição dos indutores óleo de oliva e girassol (1 g/L) (DEIVE *et al.*, 2009).

## **Conclusão**

Este trabalho demonstrou a viabilidade da produção de lipases por *Penicillium sp.* em FES, utilizando-se substratos baratos.

Verificou-se a produção de lipases nos três substratos estudados. Para trabalhos futuros serão estudados resíduos agroindustriais para a produção de lipases, como a torta de crmabe e torta de girassol.

Os resultados obtidos demonstraram que o processo da FES é viável para a produção da lipase a partir do fungo *Penicillium sp.* e que estes biocatalisadores são capazes de realizar a hidrólise de óleos e gorduras, para um posterior emprego na síntese de biodiesel.

## Agradecimentos

Agradeço à Universidade Estadual do Oeste do Paraná- Unioeste, Campus Toledo, pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

## Referências

- ATTAR, F.; AMINIFAR, M. Spectroscopic techniques used for enzyme evaluation in food industry. **International conference on nutrition and food sciences**, v. 71, p. 23-27, 2014.
- CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.MG. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2195-2210, 2006.
- CARRÃO-PANIZZII, M.C.; MANDARINO, J.M.G. **Produtos protéicos do girassol**. In: LEITE, R. M.V.B.C.; BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C. Londrina: Girassol do Brasil. Embrapa Soja, 2005. cap.4, p.51-68.
- CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, p. 146-156, 2004.
- CASTRO, H. F.; MENDES A.A.; PEREIRA, E.B.; JÚNIOR A.F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química nova**, v. 28, p. 296-305, 2005.
- CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAÏLI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive oil cake and sugar cane bagasse. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, p. 75-78, 1998.
- CUPERSMID, L.; FRAGA, A.P.R.; ABREU, E.S.; PEREIRA, I.R.O. Linhaça: Composição química e efeitos biológicos. **e-Scientia**, v. 5, n. 2, p. 33-40, 2012.
- DEIVE, F.J.; CARVALHO, E.; PASTRANA, L.; RÚA, M.L.; LONGO, M.A.; SANROMAN, M.A. Strategies for improving extracellular lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3630-3637, 2009.
- DIAZ, J.C.M.; RODRÍGUEZ, S.; ROUSSOS, J.; CORDOVA, A.; ABOUSALHAM.; CARRIÈRE, F.; BARATTI, J. Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme Microbial Technology**, v. 39, p. 1042-1050, 2006.
- FERNANDES, M.L.M.; SAAD, E.; MEIRA, J.A., RAMOS, L.P.; MITCHEL, D.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solid substrate into organic reaction medium. **Journal Molecular Catalysis B, Enzymatic**, v.23, p.8-13, 2007.
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-25, 2006.
- JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.
- JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, p. 396-403, 1998.
- KIRK, O; BORCHERT T.V.; FUGLSANG C.C. Industrial Enzymes applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p.345-351, 2002.
- OLIVEIRA, A.N; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S. e CHAGAS-JUNIOR, A.F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1, p. 61 – 66, 2007.

OLIVEIRA, A.C.D.; WATANABE, F.M.F.; RODRIGUES, M.L.F. Comparação entre fermentação no estado sólido e fermentação submersa para a produção de  $\alpha$ -amilase por *Penicillium sp.* e caracterização da enzima. **Revista eletrônica. Biociências, Biotecnologia e Saúde**, v. 1, p. 822-831, 2011.

OLIVEIRA, A.C.D.; WATANABE, F.M.F.; VARGAS, J.V.C.; MARIANO, A.B.; RODRIGUES, M.L.F. Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, p. 822-831, 2012.

OLIVEIRA, A.C.D.; WATANABE, F.M.F.; RODRIGUES, M.L.F.; VARGAS, J.V.C.; MARIANO, A.B. Lipase production by endophytic yeast through factorial design. **Academia Journal of Microbiology Research**, v.1, p. 016-021, 2013.

OLIVEIRA, A.C.D.; WATANABE, F.M.F.; FERNANDES, M.L.; MARIANO, A.B. Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1503-1511, 2014.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

PARK, E. Y.; SATO, M.; KOJIMA, S. Fatty acid methyl ester production using lipase-immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 889-896, 2006.

PILLAI, P.; MANDGE, S.; ARCHANA, G. Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13, **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1110-1117, 2011.

POLONIO, J. C.; POLLI, A.D.; BULLA, L.M.C.; ROSSETO, P.; SANTOS, C. M.; RHODEN, S.A.; PAMPHILE, A.; CONTE, H. Biorremediation potencial of microorganisms: Survey of industrial and municipal treatable waste in Maringá-PR. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, p. 31-45, 2014.

QUEIROGA, V.P.; BORBA, F.G.; ALMEIDA, K.V.; SOUSA, W.J.B.; JERÔNIMO, J.F.; QUEIROGA, D.A.N. Qualidade fisiológica e composição química das sementes de gergelim com distintas cores. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 4, n. 1, p. 27-33, 2010.

RAMOS-SÁNCHEZ, L.B.; CUJILEMA-QUITIO, M.C.; JULIAN-RICARDO, M.C.; CORDOVA, J.; FICKERS, P. Fungal lipase production by solid-state fermentation. **Bioprocess Biotechnonogy**, v. 5, p. 2-9, 2015.

RODRIGUEZ, J.A.; MATEOS, J.C.; NUNGARY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2264-2269, 2006.

SILVEIRA E. A.; TARDIOLI. P.W.; FARINAS. C.S.(2014). *Screening* de fungos lipolíticos e produção de lipases por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais do processamento do dendê. In: Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária, 2014, São Carlos-SP. **Anais do Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária**. São Carlos: Embrapa, 2014.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI, S.F.; PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, p. 185-195, 2004.

STUER, W.; JAEGER, K.E.; WINKLER, U. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 168, p. 1070-1074, 1986.

UL-HAQ, I.; IDRESS, S.; RAJOKA, M.I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 637-641, 2002.  
ZENEON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.