



FURG

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTE E LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO

Eng^o Gabriel Luis Castiglioni

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa

Orientador

Prof. Dr. Luiz Alberto Oliveira Rocha

Co-orientador

Rio Grande, RS

2006

*“A coragem é a primeira qualidade humana,
pois garante todas as outras.”
(Aristóteles)*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter nos dado o dom da vida; pela oportunidade que nos concedeu de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa; pela orientação; por suas palavras otimistas; por sua atenção, dedicação e amizade.

Ao, Prof. Dr. Luiz Alberto Oliveira Rocha, pela co-orientação; pelas sugestões que muito enriqueceram este trabalho.

Aos meus pais, Arnoldo e Nair, por todo amor, amparo e incentivo; pelos esforços que realizaram para que eu pudesse chegar até aqui.

À Fundação Universidade Federal do Rio Grande pela infra-estrutura e oportunidade concedida para a realização de um ensino de qualidade.

Enfim, a todos os professores, amigos e colegas que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO.....	4
OBJETIVOS.....	6
JUSTIFICATIVA.....	7
CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA.....	10
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
1. SURFACTANTES.....	11
2. CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA DOS BIOSSURFACTANTES.....	12
3. PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES.....	13
4. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE.....	15
5. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES.....	16
6. ENZIMAS.....	17
6.1. LIPASES.....	17
7. PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	18
8. CLASSIFICAÇÃO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	19
9. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	20
10. MODELAGEM E SIMULAÇÃO.....	21
11. MODELAGEM EM PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO.....	23
12. MODELAGEM NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	24
CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	26
ARTIGO I: MODELAGEM, OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR <i>Aspergillus fumigatus</i> UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	27
1. Introdução.....	29
2. Material e Métodos.....	30
2.1. Microrganismo.....	30
2.2. Descrição do sistema.....	30
2.3. Análises envolvidas.....	31
2.3.1. Extração do Biossurfactante.....	31
2.3.2. Medida da Atividade Emulsificante.....	32
2.4. Desenvolvimento dos modelos.....	32

2.5. Otimização.....	32
2.6. Validação dos modelos.....	32
3. Resultados e Discussão.....	33
3.1. Modelagem Numérica.....	34
3.2. Otimização Numérica.....	38
3.3. Validação dos modelos.....	39
4. Conclusões.....	40
5. Referências Bibliográficas.....	41
ARTIGO II: MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO O FUNGO FILAMENTOSO <i>Aspergillus fumigatus</i>	
1. Introdução.....	46
2. Material e Métodos.....	47
2.1. Microrganismo.....	47
2.2. Descrição do sistema.....	47
2.3. Atividade Enzimática.....	48
2.3.1. Extração da enzima.....	48
2.3.2. Determinação da Atividade Lipolítica.....	49
2.4. Desenvolvimento dos modelos.....	49
2.5. Otimização.....	49
3. Resultados e Discussão.....	49
3.1. Atividade Lipolítica.....	49
3.2. Modelagem Matemática.....	51
4. Conclusões.....	56
5. Referências Bibliográficas.....	56
ARTIGO III: PRODUÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO.....	
1. Introdução.....	62
2. Material e Métodos.....	63
2.1. Microrganismo.....	63
2.2. Descrição do sistema.....	63
2.3. Análises envolvidas.....	64
2.3.1. Extração do biossurfactante.....	64
2.3.2. Medida de Atividade Emulsificante.....	65
2.4. Tratamento dos resultados.....	65
2.5. Otimização.....	65

3. Resultados e Discussão.....	65
4. Conclusões.....	70
5. Referências Bibliográficas.....	70
ARTIGO IV: PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA ARROZEIRA COMO SUBSTRATO.....	73
1. Introdução.....	75
2. Material e Métodos.....	76
2.1. Microrganismo.....	76
2.2. Descrição do sistema.....	76
2.3. Análises envolvidas.....	77
2.3.1. Extração da enzima.....	77
2.3.2. Medida de Atividade Lipolítica.....	77
2.3.3. Análise dos resultados.....	77
3. Resultados e Discussão.....	78
4. Conclusões.....	81
5. Referências Bibliográficas.....	81
CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES.....	85
CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	99
ANEXOS.....	100

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Alguns biossurfactantes produzidos por microrganismos.....16

MODELAGEM, OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Aspergillus fumigatus* UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Tabela 1. Coeficientes C1, C2 e C3, referentes à Equação 1, obtidos através do ajuste polinomial dos resultados experimentais da produção de biossurfactante por SSF sem fonte adicional de carbono e óleo diesel.....35

Tabela 2. Coeficiente (B1 e B2) e parâmetros (a1 e a2) usados nas Equações 2 e 336

Tabela 3. Níveis dos Planejamentos Compostos Centrais (PCC) utilizados na otimização da produção de lipase para cada condição de fonte adicional de carbono (óleo diesel e sem fonte).....38

MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO O FUNGO FILAMENTOSO *Aspergillus fumigatus*

Tabela 1. Coeficientes do polinômio de segunda ordem e seus coeficientes de determinação gerados a partir do ajuste para os experimentos sem fonte adicional de carbono.....51

Tabela 2. Coeficientes (B1 e B2) e parâmetros (a1 e a2) usados nas Equações 2 e 3 para os diferentes Modelos Matemáticos.....53

Tabela 3. Níveis dos Planejamentos Compostos Centrais (PCC) utilizados na otimização da produção de lipase para cada condição de fonte adicional de carbono (óleo de soja, óleo diesel e sem fonte)54

PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA ARROZEIRA COMO SUBSTRATO

Tabela 1. Níveis de variação do Planejamento Fatorial Completo 3² utilizado para produção de lipase.....78

Tabela 2. Efeitos das variáveis sobre o processo de produção de lipase para os experimentos sem fonte adicional de carbono, óleo de soja e óleo diesel.....78

LISTA FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estruturas básicas formadas por biossurfactantes.....	11
Figura 2. Estruturas de biossurfactantes: (a) Soforolipídios; (b) Mono–raminolipídios; (c) Di–raminolipídios; (d) Surfactina.....	13

MODELAGEM, OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Aspergillus fumigatus* UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Figura 1. Esquema de fermentação em estado sólido com biorreatores de coluna.....	31
Figura 2. Perfil de Atividade Emulsificante (AE) em função do tempo de fermentação (t) para os experimentos utilizando 0 (•), 40 (□), 60 (□), 100 (•), 120 (▲) e 200 mL _{ar} ·g _{meio} ⁻¹ ·h ⁻¹ (□), (a) sem fonte adicional de carbono e (b) adicionados de óleo diesel.....	33
Figura 3. Comparação entre os resultados (—) experimentais e (.....) ajustados para os experimentos (▲) sem a utilização de fonte adicional de carbono e sem aeração e (•) utilizando óleo diesel com aeração de 100 mL _{ar} ·g _{meio} ⁻¹ ·h ⁻¹	35
Figura 4. Atividade Emulsificante, obtidas a partir do modelo desenvolvido, em função do tempo de fermentação utilizando vazões de ar de (—) 50, (----) 80 e (.....) 110 mL _{ar} ·g _{meio} ⁻¹ ·h ⁻¹ sem a utilização de fonte adicional de carbono.....	37
Figura 5. Curvas de contorno obtidas do Planejamento Composto Central para a otimização dos resultados modelados (a) sem fonte adicional de carbono e (b) óleo diesel.....	38
Figura 6. Atividades Emulsificante (•) experimentais e (□) numéricos para seus respectivos (▲ e □) tempo de fermentação, utilizando substratos (a) sem fonte adicional de carbono e (b) óleo diesel.....	39
Figura 7. Resultados do Planejamento Fatorial 2 ² utilizando os níveis de aeração e tempo de fermentação (□) -1 e -1, (•) +1 e -1, (•) pontos centrais, (□) -1 e +1, (◇) +1 e +1, respectivamente, para os experimentos (a) sem fonte adicional de carbono com e (b) óleo diesel.....	40

MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO O FUNGO FILAMENTOSO

Aspergillus fumigatus

- Figura 1.** Esquema de fermentação em estado sólido com biorreatores de coluna.....48
- Figura 2.** Resultados de Atividade Lipolítica (AL) em função do tempo de fermentação (t) para os experimentos utilizando (a) 80 e (b) 120 mL_{ar}·g_{meio}⁻¹·h⁻¹ com (----) óleo de soja, (.....) óleo diesel e (—) na ausência de fonte adicional de carbono.....50
- Figura 3.** Resultados de Atividade Lipolítica (AL) no decorrer do tempo de fermentação (t) experimentais (•) e ajustados (◐) utilizando polinômios de segunda para as condições de (a) 40 e (b) 110 mL_{ar}·g_{meio}⁻¹·h⁻¹, sem fonte adicional de carbono e com óleo diesel, respectivamente.....52
- Figura 4.** Curvas de Contorno da otimização da produção de lipase por *Aspergillus fumigatus* em função do (X₁) tempo de fermentação e (X₂) aeração, (a) sem utilizar fonte adicional de carbono, (b) utilizando óleo de soja e (c) óleo diesel.....55

PRODUÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO

- Figura 1.** Esquema de fermentação em estado sólido com biorreatores de coluna.....64
- Figura 2.** Perfil de Atividade Emulsificante (AE) em função do tempo de fermentação (t) para os experimentos utilizando (□) 0, (•) 40, (◇) 60, (◻) 100, (◐) 120 e (◑) 200 mL_{ar}·g_{meio}⁻¹·h⁻¹. (a) sem fonte adicional de carbono, (b) óleo de soja e (c) óleo diesel.....66
- Figura 3.** Gráfico de Andrews para os experimentos para as diferentes vazões de ar: (a) sem fonte adicional de carbono, (b) com óleo de soja e (c) óleo diesel.....67
- Figura 4.** Diagrama de Cluster para os resultados de Atividade Emulsificante, onde as letras referem-se aos experimentos sem fonte adicional de carbono (SF), óleo de soja (S) e óleo diesel (D) e os números à vazão de ar (mL_{ar}·g_{meio}⁻¹·h⁻¹)68
- Figura 5.** Máximas Atividades Emulsificantes (AE) encontradas para as diferentes vazões de ar estudadas para os meios (□) sem fonte adicional de carbono, (•) óleo de soja e (◻) óleo diesel, para os respectivos resultados ajustados (—), (----) e (.....).....69

PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA ARROZEIRA COMO SUBSTRATO

- Figura 1.** Esquema de fermentação em estado sólido com biorreatores de coluna.....76

Figura 2. Perfil de Atividade Lipolítica (AL) para os experimentos **(a)** sem fonte adicional de carbono **(b)** óleo de soja e **(c)** óleo diesel em função das variáveis codificadas para aeração (V) e tempo de fermentação (TF).....79

NOMENCLATURA

AE	Atividade Emulsificante	$[UE.g^{-1}]$
AL	Atividade Lipolítica	$[U.g^{-1}]$
C1	Coeficiente da equação polinomial	$[UE.g^{-1}]$
C2	Coeficiente da equação polinomial	$[UE.g^{-1}.h^{-1}]$
C3	Coeficiente da equação polinomial	$[UE.g^{-1}.h^{-2}]$
Ca	Coeficiente da equação polinomial	$[U.g^{-1}.h^{-2}]$
Cb	Coeficiente da equação polinomial	$[U.g^{-1}.h^{-2}]$
Cc	Coeficiente da equação polinomial	$[U.g^{-1}.h^{-2}]$
t	Tempo de fermentação	$[h]$
Z	Função trigonométrica parametrizada	$[mL_{ar}.g_{meio}^{-1}.h^{-1}]$
C	Equação linear parametrizada em função de Z	$[mL_{ar}.g_{meio}^{-1}.h^{-1}]$
B1	Coeficiente da equação linear	$[UE.g^{-1}]$
B2	Coeficiente da equação linear	$[UE.g^{-1}.mL_{ar}^{-1}.g_{meio}.h]$
B3	Coeficiente da equação linear	$[UE.g^{-1}]$
B4	Coeficiente da equação linear	$[UE.g^{-1}.mL_{ar}^{-1}.g_{meio}.h]$
B5	Coeficiente da equação linear	$[UE.g^{-1}]$
B6	Coeficiente da equação linear	$[UE.g^{-1}.mL_{ar}^{-1}.g_{meio}.h]$
Ba	Coeficiente da equação linear	$[U.g^{-1}]$
Bb	Coeficiente da equação linear	$[U.g^{-1}.mL_{ar}^{-1}.g_{meio}.h]$
Bc	Coeficiente da equação linear	$[U.g^{-1}]$
Bd	Coeficiente da equação linear	$[U.g^{-1}.mL_{ar}^{-1}.g_{meio}.h]$
Be	Coeficiente da equação linear	$[U.g^{-1}]$
Bf	Coeficiente da equação linear	$[U.g^{-1}.mL_{ar}^{-1}.g_{meio}.h]$
a1	Parâmetro da função trigonométrica	[adimensional]
b2	Parâmetro da função trigonométrica	[adimensional]
V	Vazão de ar	$[mL_{ar}.g_{meio}^{-1}.h^{-1}]$
R ²	Coeficiente de determinação	[adimensional]

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

RESUMO

Estudos relacionados com a produção de biossurfactantes vêm ganhando interesse pela sua vasta aplicação no setor industrial. Sua obtenção a partir de substratos renováveis e de baixo custo, bem como sua alta biodegradabilidade e baixa toxicidade ao meio ambiente é o grande potencial para futura substituição dos surfactantes químicos. Além dos biossurfactantes a aplicação das lipases vem aumentando nos últimos anos devido a recentes avanços biotecnológicos, apresentando grande importância industrial em relação às demais enzimas. Obtenção de dados referentes à produção de biossurfactantes e lipases é uma etapa determinante, não só para coleta de informações para estudos futuros, mas também na implantação e otimização de processos. A utilização de modelos matemáticos que expressem estes resultados pode reduzir consideravelmente tais esforços. Com isso, o presente trabalho foi dividido em quatro etapas: a primeira tendo como objetivo desenvolver, otimizar e validar modelos matemáticos de descrição do processo de produção de biossurfactante; segunda, otimizar experimentalmente a produção de biossurfactante; a terceira, desenvolver modelos de otimização da produção de lipase; e a quarta avaliar a produção de lipase durante o processo de fermentação. Todas as etapas tiveram por estudo a fermentação em estado sólido utilizando *Aspergillus fumigatus* em diferentes condições nutricionais e de fornecimento de ar. Foram realizados experimentos utilizando óleo de soja e óleo diesel como fontes adicionais de carbono, para posterior comparação com experimentos na sua ausência. As aerações variaram de 0 a 200 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ e as fermentações conduzidas em biorreatores de colunas com leito fixo. As condições do meio de cultivo foram mantidas em 30°C, pH 4,5, umidade de 50% e concentração inicial de inóculo 4.10⁶ esporos.g_{meio}⁻¹. Os modelos matemáticos foram obtidos usando a aeração do meio e o tempo de fermentação como variáveis de controle. A função objetivo que representa o acréscimo da concentração do biossurfactante (primeira etapa) e da lipase (segunda etapa) foi otimizada fixando a aeração e calculando o tempo ótimo nas quais as concentrações máximas de biossurfactante e enzima foram obtidas em função do tempo de fermentação. A validação dos modelos de produção do biossurfactante foi realizada por meio da comparação dos resultados experimentais de dois Planejamentos Fatoriais 2² com os resultados gerados a partir do modelo. As Atividades Emulsificante encontradas na otimização experimental da produção de biossurfactante foram 11,17 UE.g⁻¹ fornecendo 148 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ na ausência de fonte adicional de carbono, 8,47 UE.g⁻¹ com 119 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ adicionado de óleo de soja e 9,99 UE.g⁻¹ utilizando 140 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ com óleo diesel. A utilização das fontes adicionais de carbono atuou como indutor da produção de lipase, sendo que a maior Atividade Lipolítica foi encontrada no experimento sem o fornecimento de ar utilizando diesel como fonte adicional de carbono (127,22 U.g⁻¹ em 96h). Os resultados preditos comparados com os experimentais mostraram faixas estatisticamente iguais (p < 0,05) e as Atividades Emulsificante encontradas na otimização dos modelos sem fonte adicional de carbono e diesel foram, respectivamente, 8,03 UE.g⁻¹ em 104h e 7,85 UE.g⁻¹ em 111h e na otimização numérica da produção de lipase foram encontradas Atividades Lipolítica 100,31 U.g⁻¹ em 103h, 117,02 U.g⁻¹ em 90h e 124,12 U.g⁻¹ em 119h para os experimentos sem fonte adicional de carbono, óleo de soja e óleo diesel, respectivamente. Os modelos confeccionados mostram a eficiência do processo de produção de biossurfactante e lipase, tornando uma ferramenta importante na fermentação em estado sólido com *Aspergillus fumigatus*, contribuindo significativamente para o uso de tecnologias simples e de menor risco ambiental.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*, biossurfactante, fermentação em estado sólido, lipase, modelagem.

ABSTRACT

Studies related to the biosurfactants production have been gaining interest because of their vast application in the industrial sector. Their obtainance from renewable and low-priced substracts, as well as their high biodegradability and low toxicity to the environment, is the great potential for the future substitution of the chemical surfactants. Beyond the biosurfactants, the application of lipases has been increasing in the last years, due to recent biotechnological advances, and it presents great industrial importance in respect to the other enzymes. The data obtainance referent to the biosurfactants and lipases production is a determining stage, not only for the collection of information, but also in the implantation and optimization of the processes. The usage of mathematical models that express those results can, considerably, reduce efforts. Having this in mind, this work was divided in four stages: the first one has as purpose to develop, to optimize and to validate the mathematical models of description of the biosurfactants production; the second stage, has as aim to develop optimization models of lipase production; has as purpose to experimentally optimize the biosurfactants production; the third, has as purpose to experimentally optimize the biosurfactants production; the fourth stage, is the evaluation of the lipase production during the fermentation process. All the stages had as study the solid-state fermentation stage using *Aspergillus fumigatus* in different nutritional conditions and air supply. Experiments using soybean oil and diesel oil as extra sources of carbon were used, for later comparison to the experiments without their use. The aerations varied from 0 a 200 mL_{air}·g_{substrate}⁻¹·h⁻¹ and the fermentations conducted in bioreactors of columns with fixed berth. The conditions of the cultivate environment were maintained in 30°C, pH 4,5, humidity of 50% and initial concentration of inoculum 4.10⁶ esporos.g_{substrate}⁻¹. The mathematical models were obtained using the environment aeration and fermentation time as variants of control. The objective function that represents the increase of the biosurfactant concentration (first stage) and lipase (second stage) was optimized by fixating the aeration and calculating the optimized time in which the maxim biosurfactants concentration and enzyme were obtained considering the fermentation time. The validation of the models of the biosurfactants production was accomplished through the comparison of the experimental results of two Central Compound Projections 2² with the results generated from the model. The Emulsificant Activities found in the experimental optimization of the biosurfactant production were 11,17 UE.g⁻¹ providing 148 mL_{air}·g_{substrate}⁻¹·h⁻¹ in the absence of a carbon extra source, 8,47 UE.g⁻¹ with 119 mL_{air}·g_{substrate}⁻¹·h⁻¹ added of soybean oil and 9,99 UE.g⁻¹ using 140 mL_{air}·g_{substrate}⁻¹·h⁻¹ with diesel. The use of the carbon extra sources acted as inducer of the "lipase" production, and the greatest Lipase Activity was found in the experiment without the air supply using diesel oil as carbon extra source (127,22 U.g⁻¹ in 96h). The predicted results, compared to the experimental ones, showed statistically equal tracks ($p < 0,05$), and the Emulsificant Activities found in the optimization of the models without carbon and diesel extra sources were, respectively, , 8,03 UE.g⁻¹ in 104h and 7,85 UE.g⁻¹ in 111h and in the numerical optimization of the "Lipase" production were found Lipase Activity 100,31 U.g⁻¹ in 103h, 117,02 U.g⁻¹ in 90h and 124,12 U.g⁻¹ in 119h for the experiments without carbon, soybean oil and diesel oil extra sources, respectively. The manufactured models show the efficiency of the process of biosurfactants and lipase production, becoming an important tool in solid-state fermentation using *Aspergillus fumigatus*, significantly contributing to the use of simple technologies and a smaller environmental risk.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, biosurfactant, solid-state fermentation, modelling, lipase.

INTRODUÇÃO

A biotecnologia ocupa uma posição de destaque no desenvolvimento integrado e harmônico na humanidade. Sua reconhecida importância é expressa pelo seu caráter multidisciplinar, que envolve o uso da microbiologia, bioquímica e engenharia. Nos últimos anos têm-se verificado um grande e rápido desenvolvimento na área da Biotecnologia, com o aparecimento de novos processos a nível industrial. Os processos biotecnológicos têm uma grande aplicação nas indústrias de alimentos, química fina, farmacêutica e no setor ambiental.

A grande preocupação mundial, com relação à liberação de hidrocarbonetos ao ambiente, é proveniente das atividades industriais e de derramamentos acidentais. Microrganismos que possam degradar, adaptar, crescer e proliferar em ambientes contendo estes compostos têm papel importante no tratamento biológico deste tipo de poluição.

A biodegradação de efluentes e compostos ricos em hidrocarbonetos é dependente de sua estrutura química, de modo que, quanto mais solúveis, maior será sua degradabilidade. Os surfactantes são substâncias que têm a capacidade de formar micelas, reduzindo a tensão superficial, impedindo a formação de pontes de hidrogênio e certas interações hidrofílicas e hidrofóbicas, que permitem se ligarem às substâncias de polaridades diferentes, como água e óleo. Além dos surfactantes, as lipases apresentam grandes possibilidades de aplicação nas indústrias, pois estão ligadas à deterioração de alguns produtos, principalmente de laticínios e de óleos comestíveis.

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente, levaram à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes.

As lipases apresentam limitações do uso industrial devido ao seu alto custo (KANWAR *et al.* 2002). Isto faz com que os estudos das técnicas de otimização contribuam para o aumento da produtividade dos processos de fermentação, bem como para diminuição do custo total de produção (CASTILHO *et al.* 2000). A fermentação em estado sólido tem sido empregada para processos de bioconversão e possui um grande potencial para produção de enzimas. Devido à rica natureza orgânica, os resíduos agroindustriais podem servir como um substrato ideal para processos microbianos no desenvolvimento de produtos com alto valor agregado. A aplicação de recursos agroindustriais em bioprocessos se torna interessante, pois

além de fornecer alternativa de substrato, também ajuda na resolução de problemas de poluição (PANDEY, 2000).

Para aumentar a competitividade dos processos biotecnológicos, torna-se necessário a aplicação de metodologias operacionais capazes de assegurar, de modo estável e reprodutível, uma produtividade máxima com um mínimo de custos. A abordagem matemática é normalmente utilizada após a concepção e otimização do processo sob o ponto de vista das abordagens biológicas e tecnológicas.

O planejamento e otimização de processos são etapas determinantes para a obtenção de resultados satisfatórios e de alta confiabilidade. Com base nestes resultados, uma alternativa para minimizar tempo e número de experimentos tem sido o desenvolvimento de modelos matemáticos que descrevam o comportamento dos processos estudados. A modelagem e a simulação ajudam o pesquisador a formular hipóteses sobre processos e interações relevantes, a quantificar o impacto de variáveis sobre o desempenho do sistema, e a sugerir novas necessidades de experimentação.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Desenvolver modelos matemáticos que descrevam os processos de obtenção de biossurfactante e lipase por fermentação em estado sólido.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar a produção de biossurfactante a partir do fungo *Aspergillus fumigatus* por fermentação em estado sólido, utilizando biorreatores de colunas e como fontes adicionais de carbono o óleo diesel e o óleo de soja;

Avaliar a produção de lipase durante o processo de fermentação em estado sólido;

Modelar, simular e otimizar a produção de biossurfactante e de lipase por fermentação em estado sólido, verificando a influência da aeração e do tempo de fermentação através do uso de diferentes condições nutricionais para o fungo *Aspergillus fumigatus*;

Validar o modelo de produção de biossurfactante por fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *Aspergillus fumigatus*.

JUSTIFICATIVA

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais, o Rio Grande do Sul possui 18% da capacidade instalada de processamento de oleaginosas do Brasil, o que representa 19.000 toneladas/dia. Os resíduos líquidos gerados por estas indústrias geralmente apresentam alta complexidade física e química, dificultando seu tratamento e causando riscos ao meio ambiente onde são descartados.

Além deste, um dos ramos das atividades agroindustriais que apresenta o mesmo problema, relativo ao tratamento de seus efluentes, são as indústrias da pesca. Estas indústrias, na cidade do Rio Grande, processam aproximadamente 70.000 toneladas/ano de matéria-prima. Empregam 2.000 pessoas diretamente e outras 5.000 nas atividades de pesca artesanal e na produção primária do pescado.

Outro setor que também apresenta problemas relacionados ao meio ambiente, em proporções superiores, é a indústria petroquímica. O petróleo, apesar de seus benefícios para sociedade como uma das principais fontes de energia, é um produto tóxico para os organismos, contaminando diretamente os ecossistemas pela fuga natural dos seus reservatórios, derrames de navios petroleiros, acidentes em refinarias ou plataformas de extração, entre outros.

Mais de 10 bilhões de toneladas por ano de petróleo são produzidas mundialmente e estima-se que 0,6% desta produção termine poluindo os oceanos. Nenhuma estimativa comparável foi feita em relação à poluição terrestre por hidrocarbonetos de petróleo. Entretanto, considerando que a maior parte do petróleo é produzida, refinada e utilizada sobre a terra, é de se esperar um valor similar ou maior do que o citado para o ambiente marinho.

Devido à constante movimentação de petróleo na costa marítima da região, existe a possibilidade de ocorrerem problemas de conseqüências mais graves, pois um derrame de petróleo no mar prejudicaria a economia da cidade do Rio Grande, que se baseia na indústria pesqueira. Estas evidências tornam urgente o desenvolvimento de tecnologias para diminuir o impacto ambiental ocasionado por estes acidentes e, concomitantemente, o tratamento dos efluentes das indústrias processadoras de óleos, sendo a biorremediação um dos métodos mais estudados.

BOOPATHY (2000) define a biorremediação como o uso inteligente do potencial que os microrganismos apresentam em degradar compostos poluentes, reduzindo o grau de contaminação do local sujeito à degradação. Os biossurfactantes vêm sendo testados na biorremediação como uma alternativa eficiente e

economicamente viável no tratamento de regiões contaminadas pela presença de petróleo e seus derivados.

Atualmente, os estudos da produção de biossurfactantes se concentram em fermentação submersa. Este modo de produção envolve custos elevados, pois as etapas de extração e purificação necessitam de equipamentos e métodos complexos, resultando em altos investimentos e tempo a ser empregado. Poucos registros são encontrados na literatura sobre a utilização do cultivo em estado sólido para a produção de biossurfactantes, sendo uma área promissora de pesquisa, ainda a ser desenvolvida.

A adoção de um maior rigor nos padrões de descarte de águas residuárias tem motivado a realização de pesquisas, cujo objetivo é reduzir o impacto ambiental, especialmente em efluentes contendo elevados teores de lipídeos. A Política Nacional de Recursos Hídricos, instituída pela Lei Federal nº 9.433 de 8 de janeiro de 1997 trata da cobrança pelo uso dos corpos d'água para o lançamento de despejos líquidos. Dentro deste contexto, processos alternativos vêm sendo utilizados na redução da concentração de lipídeos contidos nesses efluentes por meio de ação de enzimas, particularmente lipases. Essas enzimas apresentam uma importância particular, pelo fato de hidrolisarem especificamente óleos e gorduras, o que pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor de gordura (MENDES *et al.*, 2005).

A produção de biossurfactante e lipase dispensa o uso de substratos de alto custo, tornando o uso de resíduos agroindustriais, ricos em hidrocarbonetos, uma alternativa de fonte de carbono de grande disponibilidade e baixo custo. ROYCE (1993) afirma que o meio de cultivo utilizado para a produção de metabólitos secundários representa 60 a 90% dos custos de fermentação. Para a obtenção de metabólitos primários esse custo representará 40 a 70% do custo total.

A aplicação destes substratos não convencionais seria uma possibilidade atrativa, já que são matérias-primas de fácil obtenção e baixo custo, encontrados em todo território brasileiro. A região Sul do Rio Grande do Sul é a maior produtora de arroz da América Latina, oferecendo uma grande variedade de substratos e suportes para serem utilizados na fermentação em estado sólido, dentre eles, a casca de arroz e os farelos de arroz gordo e desengordurado.

O Brasil, pelas dimensões continentais e pelas características climáticas e territoriais, possui biodiversidade inigualável no mundo e grande abundância de biomassa e resíduos agro-industriais, que constituem a matéria-prima para os processos biotecnológicos. Esses fatores mostram quão imperativos é o

desenvolvimento dos bioprocessos no país, de forma a auxiliar no desenvolvimento de novos produtos e na redução de custos em diversos processos biotecnológicos.

O estudo de sistemas ou fenômenos, muitas vezes depara-se com dificuldades em analisá-los na sua forma natural de existência, por dificuldade de acesso, medição ou mesmo altos riscos e custos envolvidos. Por isto são utilizadas formas de representação que permitam manipular e compreender processos estudados, quer em seus aspectos qualitativos, quer nos quantitativos. Uma alternativa que permite prever antecipadamente resultados referentes a processos de produção, como é o caso dos biossurfactantes e lipases, é a utilização de modelos matemáticos capazes de gerar resultados que possam prever as influências das variáveis mais significativas. Estes resultados permitem minimizar tempo e número de experimentos, possibilitando um melhor planejamento dos processos em estudo.

A modelagem de sistemas tem se desenvolvido de forma paralela ao avanço do conhecimento, chegando alguns autores a afirmar que o progresso da ciência está associado ao avanço das técnicas de confecção de modelos.

A descrição do sistema, a fim de satisfazer as necessidades de estudos e análises, consiste em escolher adequadamente procedimentos e formas de representar componentes e expressar as relações entre os mesmos por expressões lógicas ou matemáticas. Este processo é conhecido como abstração e o resultado expresso é conceituado como o modelo do sistema, idéia, fenômeno ou instrumento em estudo.

CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. SURFACTANTES

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

A produção mundial de surfactantes ultrapassa 3 milhões de toneladas por ano (BANAT, 2000). Quase todos os surfactantes atualmente utilizados são quimicamente derivados do petróleo, onde segundo BOGNOLO (1999), 70 a 75% destes são consumidos por países industrializados. Entretanto, o interesse por surfactantes microbiológicos (biossurfactantes) tem aumentado nos últimos anos devido às suas diversidades e potenciais aplicações nas indústrias de processamento de alimentos, áreas de proteção ambiental, médica, recuperação de resíduos oleosos, entre outras (LANG, 2002; BEZBORODOV, 1991 citado por TURKOVSKAYA *et al.*, 1999).

Uma grande quantidade de compostos com propriedades tenso-ativas são sintetizados por organismos vivos, que vão desde plantas (saponinas), microrganismos (glicolipídios), até humanos (sais biliares) (BOGNOLO, 1999). INOH *et al.*, (2003) afirmam que estes compostos de superfície ativa podem ser produzidos por microrganismos capazes de crescerem em substratos insolúveis em água, apresentando muitas atividades biológicas.

Os biossurfactantes são compostos anfipáticos, com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica (LANG, 2002) que são capazes de formar diversas estruturas, tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares e estruturas lamelares (CHAMPION, 1995). Suas estruturas básicas são mostradas na Figura 1.

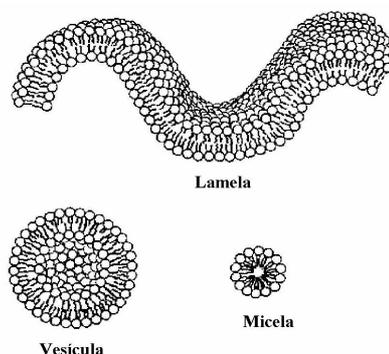


Figura 1. Estruturas básicas formadas por biossurfactantes.

Fonte: CHAMPION *et al.*, 1995.

O interesse pelos biossurfactantes microbianos aumentou durante a última década (CAMEOTRA & MAKKAR, 2004), pois apresentam a capacidade de atuar na interface das células apresentando diferentes polaridades, em especial óleo/água, ar/água e agindo como agentes umectantes em superfícies sólidas (água/sólido). Esse processo dinâmico é baseado na habilidade dos biossurfactantes em reduzir a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e outras interações hidrofóbicas e hidrofílicas, aumentando a área superficial destes, levando a um aumento da biodisponibilidade e conseqüente biodegradabilidade (ANNA, 2000).

O mecanismo de atuação da maioria destas combinações ainda não está bem elucidado, embora seja provável que as propriedades de superfície da membrana representem um papel importante (CAMEOTRA & MAKKAR, 2004).

2. CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA DOS BIOSURFACTANTES

Biossurfactantes são emulsificantes naturais de hidrocarbonetos e podem ser produzidos total ou parcialmente extracelulares por bactérias, bolores e levedura. (BICCA *et al.*, 1999).

Os biossurfactantes estruturalmente apresentam combinações diversas, principalmente aqueles produzidos por microrganismos na presença de hidrocarbonetos (LANG & WULLBRANDT, 1999). Em sua grande maioria são lipídios, os quais apresentam uma estrutura típica de surfactante. A porção lipofílica dos lipídios normalmente é um hidrocarboneto com um ou mais ácidos graxos, os quais podem ser saturados, insaturados ou conter estruturas cíclicas. A porção polar, do biossurfactante pode ser simples (carbonila, hidroxila) ou uma mistura complexa de fosfatos, carboidratos, aminoácidos, dentre outros (LANG, 2002; COOPER, 1986).

BANAT (2000) classifica os biossurfactantes em cinco grupos:

- Glicolipídios: trealose, soforose e raminolipídio;
- Liposacarídeos: emulsionantes de alto peso molecular, produzidos extracelularmente pela degradação de hidrocarbonetos por bactérias, tais como, o *Acinetobacter calcoaceticus*;
- Lipopeptídios: Subtilisin, produzido pelo *Bacillus subtilis*, tido como o biossurfactante mais ativo até agora conhecido;
- Fosfolipídios: apesar de presente em muitos microrganismos, existem poucos exemplos de produção extracelular, sendo o mais notável deles o biossurfactante produzido pelo *Corynebacterium lepus*;

- Ácidos graxos e lipídeos neutros: ácido ustálgico, ácidos corinomicólicos e as proteínas hidrofóbicas.

Os biossurfactantes são constituídos por diversos grupos químicos diferentes. Na Figura 2 podem ser observadas algumas estruturas.

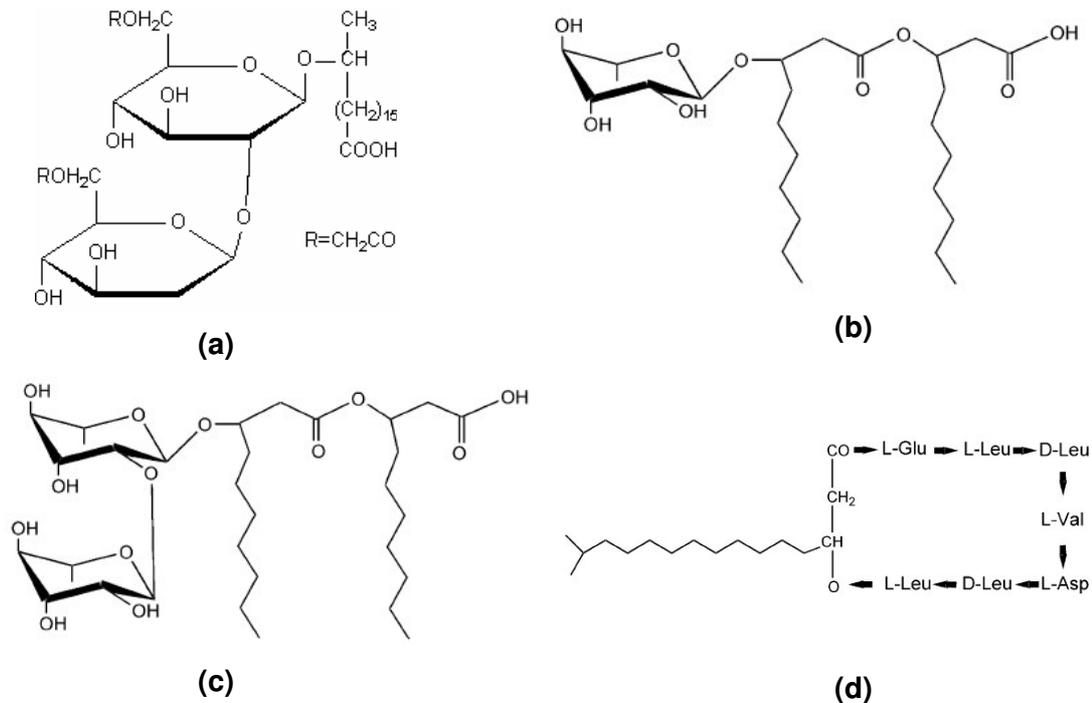


Figura 2. Estruturas de biossurfactantes: (a) Soforolipídeos; (b) Mono-raminolipídeos; (c) Di-raminolipídeos; (d) Sufactina. Fontes: LANG, 2002; BOGNOLO, 1999; SANDOVAL *et al.*, 1999; KOWALL *et al.*, 1998.

3. PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DOS BIOSURFACTANTES

Os surfactantes sintéticos são estruturas relativamente recentes, apresentam propriedades que proporcionaram avanços nos mais diversos ramos industriais, porém a sua substituição pelos surfactantes biológicos apresenta vantagens por serem menos tóxicos, menos alergênicos, biodegradáveis, o que reflete num menor impacto ambiental (TURKOVSKAYA *et al.*, 1999).

BOGNOLO (1999) mostra algumas vantagens dos surfactantes naturais em relação aos sintéticos:

- Atividade de superfície e interface: os biossurfactantes são mais efetivos e eficientes que, por exemplo, sulfonatos aniônicos, já que reduzem a tensão superficial mais rapidamente. Os biossurfactantes de alto peso molecular adsorvem na interface óleo-água através de múltiplos pontos de ancoragem,

aumentando a estabilidade das cadeias em uma única fase, o que produz uma efetiva estabilidade estérica. A grande área interfacial coberta pela molécula adsorvida e a multiplicidade de pontos de ancoragem asseguram que não ocorra desorção durante a colisão de partículas, e aumentam grandemente a estabilidade das emulsões. A baixa mobilidade dos macrosurfactantes pode ser corrigida através da adição de pequenas quantidades de biossurfactantes;

- Tolerância à temperatura: alguns biossurfactantes e sua atividade superficial não são afetados, mesmo a altas temperaturas (90 °C);
- Tolerância à força iônica: os biossurfactantes não precipitam em soluções salinas de até 10%, enquanto que soluções de 2-3% de sal são suficientes para desativar os surfactantes químicos;
- Biodegradabilidade: os biossurfactantes são facilmente degradados na água ou no solo;
- Emulsões feitas com biossurfactantes podem ser facilmente quebradas por adição de enzimas, como, por exemplo, a depolimerase, que pode quebrar a emulsão de hidrocarbonetos em óleo.

O potencial de aplicação de compostos de superfície ativa, produzidos a partir de microrganismos, é baseado nas propriedades de emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, de-emulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades fornecem potencial de aplicação nas indústrias de alimentos, agrícola, construção, bebidas, papel, metal, têxtil, farmacêutica, cosmética (NITSCHKE & PASTORE, 2002; MULLIGAN *et al.*, 2001; BOGNOLO, 1999; FIECHTER, 1992).

O principal uso comercial dos biossurfactantes está na remediação, por causa de sua capacidade em estabilizar emulsões. Isto faz com que ocorra um aumento na solubilidade e na disponibilidade de contaminantes hidrofóbicos, aumentando o potencial para biodegradação. Uma propriedade de muitos biossurfactantes é a atividade antimicrobiana. CAMEOTRA & MAKKAR (2004) relatam que certos lipopeptídeos podem agir como substâncias antivirais, antibióticos, agentes antitumorais, imunorreguladores, toxinas específicas e inibidores enzimáticos. Outros usos médicos dos biossurfactantes incluem o papel de agentes antiaderentes para patógenos, sendo útil para tratar muitas doenças, bem como uso terapêutico e probiótico (SINGH & CAMEOTRA, 2004).

Um dos usos para os biossurfactantes que tem recebido constante atenção é conhecido por MEOR (Microbial-Enhanced Oil Recovery), cujo processo envolve a introdução de microrganismos em reservatórios de óleo cru para melhorar a extração da borra oleosa e recuperar frações de hidrocarbonetos. Este método também está

sendo proposto e testado em algumas partes do mundo, para combater a poluição ambiental gerada por derramamentos acidentais de óleo. Este processo previne a persistência de camadas de óleo no ambiente, sendo estes responsáveis pela depleção do oxigênio e intoxicação da vida marinha (DYKE *et al.*, 1991). Acidentes com petróleo têm sido muito freqüentes, portanto tem-se nesta área um vasto campo para a aplicação dos biossurfactantes.

A indústria petrolífera é o maior mercado para os biossurfactantes, onde são utilizados diretamente na produção dos derivados do petróleo ou são incorporados nas formulações de óleos lubrificantes (DYKE *et al.*, 1991). Outro uso está relacionado com o potencial de recuperação de derivados de petróleo na limpeza de tanques, preparo de misturas óleo-álcool para combustíveis e dispersão de óleos derramados em ecossistemas aquáticos (LIMA, 1996).

4. PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Os biossurfactantes são produzidos na superfície da célula microbiana (DYKE *et al.*, 1991), apresentando diferentes propriedades químicas e tamanho molecular. Enquanto os surfactantes microbianos de baixo peso molecular são em geral glicolipídicos, os de alto peso molecular são heteropolissacarídeos ou complexos glicoprotéicos. O rendimento dos biossurfactantes depende do substrato utilizado para a produção, do crescimento microbiano e da linhagem utilizada (KARANTH *et al.*, 1999).

Alguns microrganismos podem produzir biossurfactantes quando crescem em diferentes substratos, estes podem variar desde carboidratos até hidrocarbonetos. A mudança de substratos altera a estrutura do biossurfactante e, conseqüentemente as propriedades emulsificantes. Estas mudanças podem ser benéficas quando se deseja propriedades específicas para uma aplicação direcionada (COOPER, 1986). Diversos são os estudos realizados por vários autores na produção de biossurfactantes, envolvendo propriedades físico-químicas e nutricionais (BATISTA, *et al.*, 2006; SHIN & KIM, 2004; WEI *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2002; MAKKAR & CAMEOTRA, 1997).

A maioria dos biossurfactantes são liberados no meio de cultura durante o estado estacionário ou então, na fase de crescimento exponencial. No caso dos bioemulsificantes, são usualmente produzidos quando as culturas alcançam o estágio estacionário de crescimento (RON & ROSENBERG, 2001).

5. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSURFACTANTES

A produção de biossurfactantes, por diferentes microrganismos, foi bastante estudada por vários pesquisadores. Dentre os microrganismos têm-se: *Pseudomonas aeruginosa* (ANNA *et al.*, 2002; TURKOVSKAYA *et al.*, 1999; HARVEY *et al.*, 1990), *Candida lipolytica* (VANCE-HARROP *et al.*, 2003), *Candida antarctica* (KIM *et al.*, 2002), *Rhodococcus ruber* e *Rhodococcus erythropolis* (BICCA *et al.*, 1999), *Serratia marcescens* (WEI *et al.*, 2004) e *Bacillus subtilis* (FOX & BALA, 2000).

A Tabela 1 apresenta os principais biossurfactantes produzidos por alguns microrganismos.

Tabela 1. Alguns biossurfactantes produzidos por microrganismos.

Biossurfactante	Microrganismo
Heteropolissacarídeo	<i>Arthrobacter</i> RAG-1
Lipídios de trehalose, sacarose ou frutose	<i>Arthrobacter</i> sp
Peptidolipídio	<i>Bacillus licheniformis</i> JF-2
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Surfactina	<i>Bacillus pumilus</i> A1
Ácidos graxos	<i>Candida tropicalis</i>
Lipídios neutros	<i>Clostridium pasteurianus</i>
Fosfolipídios	<i>Corinebacterium inaldiosus</i>
Proteína hidrófoba	<i>Achromobacterium anthropil</i>
Raminolipídio	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Raminolipídio	<i>Bacillus</i> sp. AB-2
Peptidolipídio	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Glicolipídio	<i>Rhodococcus</i> sp ST-5
Polissacarídios	<i>Rhodococcus</i> sp 33
Lipoproteína	<i>Bacillus licheniformis</i>

Fonte: BANAT (2000), BANAT (1993), ROBERT *et al.*, (1989), MORIKAWA *et al.*, (1992), KOSARIC *et al.*, 1987.

Os locais com maior potencial para fornecer microrganismos assimiladores de hidrocarbonetos são aqueles onde ocorreu alguma contaminação por parte destes (SAMPAIO, 1995).

A descoberta de certas bactérias que vivem em sedimentos marinhos, inclusive nas areias das praias, podem degradar componentes do petróleo, abriu a

possibilidade de usar métodos biológicos para o tratamento dos derramamentos (CRAPEZ *et al.*, 2002).

6. ENZIMAS

Grande parte da história da bioquímica vem das pesquisas relacionadas com enzimas. A primeira teoria geral de catálise química, publicada em 1835 por J. J. Berzelius, incluía um exemplo do que se conhece hoje como enzima. Ainda que Louis Pasteur reconhecesse que a fermentação era catalisada por enzimas, ele postulou, em 1860, que elas estavam intrinsecamente ligadas com a estrutura e a vida da célula do levedo (LEHNINGER, 1976).

A biotecnologia da produção de enzimas parte de duas fontes: uma formada por tecidos animais e vegetais, onde podem ser extraídas e usadas in natura ou, então, extraídas e purificadas; a outra são cultivadas, constituída de enzimas extraídas de meios de cultivo microbiológico, desenvolvidos por técnicas fermentativas. No primeiro caso, se enquadram algumas enzimas, aplicadas há séculos pelo homem; segundo, estão as enzimas, produzidas através de cultivo industrial de microrganismos sobre meios ou substratos, naturais ou sintéticos. Atualmente, em torno de 2000 enzimas são conhecidas e caracterizadas quimicamente, no entanto, não passam de 20 as que são produzidas e aplicadas em escala industrial. O cultivo de microrganismo para obter enzimas para esta finalidade é uma atividade biotecnológica em constante crescimento (REGULY, 2000).

Diversos são os setores que utilizam enzimas, entre eles estão as indústrias de alimentos, química, farmacêutica, entre outras (SCRIBAN, 1985). Embora nos últimos anos, a utilização de enzimas na indústria esteja aumentando rapidamente, ainda existe um grande campo para a sua expansão (JESUS *et al.*, 1997).

6.1. LIPASES

Os aspectos biológicos, fisiológicos e a aplicação industrial de enzimas lipolíticas têm sido bastante estudados, onde nos últimos anos as pesquisas envolvendo sua utilização têm sido cada vez mais intensificadas (KOBLOITZ & PASTORE, 2004). Entre os processos químicos de maior interesse pelas indústrias estão as reações catalisadas por estas enzimas, as quais representam aproximadamente 20% das biotransformações realizadas atualmente (FABER, 1997, citado por OLIVEIRA *et al.*, 2000).

As lipases (triacilglicerol hidrolases EC 3.1.1.3) são responsáveis pela catalise de reações que envolvem hidrólise e síntese de éster a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeias longas, fazendo com que sejam consideradas como um importante grupo de biocatalisadores (CASTRO & ANDERSON, 1995). A sua atuação se dá na interface óleo-água (HATZINIKOLAOU *et al.*, 1996; CHRISTAKOPOULOS *et al.*, 1992).

O potencial biotecnológico das lipase se deve à alta estabilidade em solventes orgânicos, não requerer a presença de cofatores, possuírem uma ampla especificidade pelo substrato e apresentarem alta enantiosseletividade (CASTRO & ANDERSON, 1995).

Apesar das lipases serem produzidas por um grande número de microrganismos, a utilização de fungos se destaca por apresentar produção normalmente extracelulares, o que facilita sua extração (LONG *et al.*, 1996).

7. PROCESSOS FERMENTATIVOS

A fermentação, de um modo geral, se caracteriza pela aplicação do metabolismo microbiano na transformação de uma matéria-prima simples em produtos de maior valor agregado, como por exemplo, ácido cítrico, antibióticos, entre outros (TREVAN *et al.*, 1990).

Na fermentação os processos podem ser descritos como um somatório de etapas, onde o meio de fermentação, convenientemente preparado para o fornecimento de ar (processo aeróbio) e nutrientes, são com frequência esterilizados, com objetivo de eliminar microrganismos indesejáveis. No fermentador, o meio recebe uma suspensão de microrganismo (inóculo) capaz de garantir a fermentação em condições econômicas. O processo de fermentação é, então, controlado (temperatura, pH, agitação, concentração de nutrientes, entre outros) de modo a manter condições favoráveis ao crescimento e metabolismo do microrganismo. Completada a fermentação, o meio fermentado é encaminhado aos tratamentos finais, com vistas a separação de produtos e ao tratamento de resíduos (BORZANI *et al.*, 1975).

O metabolismo celular do microrganismo, resultado do seu mecanismo enzimático e da rota metabólica que este utiliza para o aproveitamento de carboidratos e gorduras, dependente da disponibilidade de oxigênio ou não. Em qualquer caso, os microrganismos obtêm sua energia da oxidação da matéria orgânica, que é fundamentalmente um processo de desidrogenação. Como a queima é um processo gradual e não uma simples oxidação até CO₂, cada reação enzimática é catalisada por distintas enzimas em múltiplas etapas. Somente os microrganismos cujo metabolismo

seja respiratório, isto é, que conduz até o oxigênio receptor para formar a água, é que obtém a máxima energia (REGULY, 1996).

8. CLASSIFICAÇÃO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS

Os processos fermentativos são comumente classificados quanto à condução do processo, quanto ao modo de cultivo, ou seja, processos em estado sólido ou submerso (REGULY, 2000).

Quanto à condução do processo, podem ser descontínuos, contínuos ou semicontínuos. Nos processos descontínuos, a fermentação é iniciada a partir do momento que o substrato esterilizado é inoculado, permitindo que ocorra o crescimento microbiano. No tempo final de fermentação, obtém-se os produtos. Já nos processos semicontínuos carrega-se o fermentador com meio, adiciona-se o inóculo e aguarda-se o término da fermentação, retira-se, então, da doma, um certo volume de fermentado e adiciona-se igual volume de meio novo; e assim por diante, às vezes durante meses consecutivos. O controle do rendimento do processo poderá determinar o momento em que o trabalho pela técnica descrita deva ser suspenso, para ser iniciada uma nova fermentação com inóculo novo. Nos processos contínuos, a matéria-prima é adicionada com uma vazão constante e o meio fermentado é retirado com a mesma vazão de alimentação, ou seja, a fermentação contínua ocorre num sistema aberto, onde o substrato é continuamente alimentado ao biorreator e quantidade equivalente de substrato fermentado é retirada do mesmo (BORZANI *et al.*, 1975).

Os processos fermentativos, quanto à quantidade de água no meio, podem ser submersos ou em estado sólido. Quanto ao suprimento de oxigênio, há que distinguir entre fermentações aeróbias e anaeróbias, segundo a natureza dos microrganismos por estas responsáveis, isto é, conforme o seu metabolismo celular, resultado do seu mecanismo enzimático. É a rota metabólica dos microrganismos em questão que utilizam para o aproveitamento de carboidratos e gorduras, conforme haja, ou não, disponibilidade de oxigênio que determina a aerobiose ou anaerobiose do processo fermentativo (REGULY, 1996).

9. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

O processo de fermentação em estado sólido (SSF) é conhecido desde a antiguidade nos países Asiáticos (COUTO & SANROMÁN, 2005). A SSF foi comumente definida como o cultivo de microrganismos em uma matriz úmida sólida, ausente de uma fase aquosa macroscópica (água livre), que tem a capacidade de manter a água no material sólido. Esta matriz pode ser substratos naturais, usados como fonte de energia, ou meios inertes com solução nutriente (PANDEY, 2003). Entende-se por água livre a não separação ou escoamento da água da matriz sólida, que deve conter umidade suficiente, na forma adsorvida ou complexada, permitindo o crescimento do microrganismo (COSTA, 1996). O teor de umidade máximo é função do tipo de substrato, ou seja, função das propriedades que o mesmo possui em adsorver água, porém, na maioria dos substratos a água torna-se aparente antes do nível de 80% de umidade. O nível de umidade abaixo de 12% praticamente cessa a atividade biológica (MORAES, 1999).

Apesar da fermentação em estado sólido ser antiga, durante os últimos 20 anos houve um maior interesse pelo seu uso. O potencial de obtenção de produtos em SSF, atualmente há relativamente poucas aplicações comerciais. Esta situação pode ser atribuída à complexidade do sistema, pois as limitações de transferência de massa são intrínsecas a escala em que o sistema é submetido (MITCHELL *et al.*, 2003).

A fermentação recebe grande atenção das pesquisas, porém durante a última década foram feitos avanços significativos no que se refere ao desempenho de biorreatores de SSF (MITCHELL *et al.*, 2003).

Visto que os bioprocessos em estado sólido de grande escala são de difícil aplicação, devido a várias razões técnicas, a SSF deve ser vista como complementar para a fermentação submersa (FS) comumente utilizada (MITCHELL *et al.*, 2000). Há, porém, uma necessidade para tecnologia de SSF, visto que certos produtos (enzimas, metabólitos, esporos) não podem ser produzidos por FS ou não apresentem características desejadas. Numerosos trabalhos empregando SSF têm mostrado bons resultados com respeito à produtividade e a qualidade de produtos, comparados com aqueles produzidos por FS (HÖLKER *et al.* 2004 citado por LENZ *et al.*, 2004).

A SSF é aplicada para a produção de alimentos, biopesticidas e substâncias químicas dos mais diversos tipos (SMITS *et al.*, 1999). O grande potencial dos processos de SSF é principalmente na produção de enzimas através de fungos filamentosos (PANDEY, 1999).

Em um processo de fermentação, o biorreator é o ambiente para o crescimento e atividade dos microrganismos e suas reações metabólicas. Durante o

processo de fermentação, o biorreator deve ser capaz de prevenir a liberação da biomassa interna para o ambiente, bem como prevenir a entrada de substâncias estranhas ao meio da reação (PANDEY, 1991). No caso dos biorreatores de Coluna, estes podem consistir em um tubo de vidro ou de plástico, colocado na vertical e com um leito fixo de substrato, podendo possuir encamisamento externo para controle de temperatura, utilizando circulação de água. Alternativamente, o controle de temperatura pode ser feito pela manutenção de todo o conjunto em uma atmosfera controlada (COSTA, 1996).

Devido aos baixos níveis de água no sistema, os fungos filamentosos, têm recebido a maioria das atenções nas pesquisas, pois apresentam capacidade de crescimento nessas condições. Como exemplos, podem ser citados, dentre muitos outros, o uso de culturas de *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium* ou *Aspergillus* para obtenção de enriquecimento protéico e produção de enzimas, *Mucor* ou *Rhizopus* na produção de renina microbiana, *Penicillium* para produção de penicilina e *Fusarium* ou *Gibberella* para obtenção de ácido giberético (BORZANI *et al.*, 2001).

A seleção adequada do substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação. Para o caso do processo em estado sólido, os substratos sólidos são constituídos basicamente de polímeros orgânicos, que se caracterizam pela insolubilidade em água e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem a adição de nutrientes suplementares. Os resíduos de origem agroindustrial são os substratos mais utilizados neste processo, tais como: polpa de café, farelo de cereais, palhas, bagaço de cana, cascas de frutas processadas, batata, farinha de cereais, mandioca, entre outros (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; GUTIERREZ *et al.*, 1992). Diversos são os substratos sólidos que podem ser utilizados na SSF (DURAND *et al.*, 1993). O uso de metodologias para desenvolver processos de produção mais limpos além de reconhecido como processo que reflete em uma perspectiva ambientalmente integrada, envolve preocupações de sua condução para melhoria ambiental. Além de focalizar o desempenho econômico do processo, há a incorporação da preocupação com o meio ambiente, minimizando o impacto causado (JIA *et al.*, 2006).

10. MODELAGEM E SIMULAÇÃO

A modelagem de sistemas tem desenvolvimento paralelo ao avanço do conhecimento, chegando alguns autores a afirmar que o progresso da ciência está associado ao avanço das técnicas de confecção de modelos. Uma alternativa que

permite prever antecipadamente resultados referentes a processos de produção, é a utilização de modelos matemáticos capazes de gerar resultados que possam prever as influências das variáveis mais significativas. Estes resultados permitem minimizar tempo e número de experimentos, possibilitando um melhor planejamento dos processos em estudo (STRACK, 1984).

A máxima capacidade de produção é uma das metas em qualquer processo biotecnológico. Vários são os esforços para otimização destes processos utilizando diferentes meios de cultivo e o desenvolvimento de modelos matemáticos que possam ser amplamente usados (DAKHMOUCHE *et al.*, 2006). Segundo MATURA *et al.* (2004) citado por IGNÁCIO & FILHO (2004), os modelos matemáticos de otimização têm duas formas gerais de uso. A primeira, o modelo é usado como nível estratégico, implicando em uma resolução de problemas com intervalos de tempo consideravelmente longos, o que é intrínseco em uma decisão estratégica. A segunda, o modelo atende a uma necessidade ao nível tático-operacional.

STRACK (1984) menciona que a simulação é uma técnica que pode ser amplamente utilizada nas mais diversas áreas. O método de simulação é empregado com grande eficiência como elemento auxiliar na tomada de decisões, principalmente em planejamentos a médio e longo prazo e em situações que envolvem custo e riscos elevados. Os modelos de simulação são muito eficazes e versáteis no estudo dos mais diferentes problemas, permitindo o exame específico com grande precisão. O uso da simulação pode ser considerado quando uma ou mais das seguintes condições existem:

- Não há uma formulação matemática completa para o problema;
- Não há método analítico para a resolução do modelo matemático;
- A obtenção de resultados com o modelo é mais fácil de ser realizada por simulação que por método analítico;
- Não existe habilidade pessoal para a resolução do modelo matemático por técnicas analíticas ou numéricas;
- É necessário observar o desenvolvimento do processo desde o início até os resultados finais, e são necessários detalhes específicos;
- Não é possível ou é muito difícil e de custo elevado a experimentação no sistema real;
- É desejado estudar longos períodos de tempo ou são necessárias alternativas que os modelos físicos dificilmente fornecem.

Técnicas de inteligência artificial foram usadas durante vários anos na modelagem de bioprocessos. Muitos trabalhos centralizaram estudos nos modelos

para monitoramento e controle de produção em processos industriais onde são necessários modelos robustos, precisos para um intervalo de condições operacionais (HODGSON *et al.*, 2004).

O estudo de sistemas ou fenômenos, muitas vezes depara-se com dificuldades em analisá-los na sua forma natural de existência, por dificuldade de acesso, medição ou mesmo altos riscos e custos envolvidos. Por isso são utilizadas formas de representação que permitam manipular e compreender processos estudados, quer em seus aspectos qualitativos, quer nos quantitativos (STRACK, 1984).

ROHNER & MEYER (1995) desenvolveram um modelo que descreve um bioprocessos que resulta em passos industriais completamente automatizados, mostrando que a modelagem provou ser uma ferramenta para melhor observação dos fundamentos bioquímicos nos processos. Combinando modelagem com simulação, o tempo e custo de desenvolvimento podem ser reduzidos drasticamente.

11. MODELAGEM EM PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO

A fermentação é um processo normalmente complexo devido à síntese de produtos pelo microrganismo, influência de fatores externos e internos (concentrações de substrato, produto, pH, etc), entre outros. Estes processos são descritos por equações não lineares, tendo o tempo como o parâmetro variado. Geralmente o resultado ótimo e o perfil de controle são calculados para os parâmetros que são assumidos serem constantes (não podem ser percebidas as ótimas soluções na prática) ou quando os parâmetros são funções das condições físicas ou químicas do processo, como pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, entre outros. Esta última pode ser expressa analiticamente como uma função linear com condições de processo variável, escolhida para introdução de controle (TSONEVA *et al.*, 1998).

CORSANO *et al.* (2004) direcionaram estudos para otimização dos processos de fermentação, descrevendo, de modo geral, o comportamento no fermentador como um conjunto de equações diferenciais e algébricas descritas como diferenças finitas em um ambiente de equações orientadas. Alguns trabalhos mencionam modelos cinéticos detalhados e custos operacionais correspondendo ao tipo de inóculo, sendo incluídos diferentes tipos de substratos. O número ótimo de unidades a serem usadas no processo, bem como as melhores condições de operação para cada unidade, é simultaneamente determinado. O modelo é formulado como uma sucessão de programação de problemas não lineares.

ZHANG et al. (1997) formularam um modelo matemático para simular o crescimento de células, perda de plasmídeo e produção de proteína recombinante durante o cultivo aeróbico da levedura recombinante *S. cerevisiae*. O modelo desenvolvido foi baseado em três simplificações que envolvem o metabolismo da levedura: fermentação de glicose, oxidação de glicose e oxidação de etanol. O crescimento da célula foi expresso como uma combinação destes eventos metabólicos. Através da simulação entre os valores gerados pelo modelo e os obtidos experimentalmente foi possível observar excelentes resultados.

HODGSON et al. (2004) desenvolveram um trabalho para responder algumas perguntas gerais sobre os modos mais efetivos e úteis em modelagem de bioprocessos. Os pesquisadores investigaram características de modelos que apresentam uma boa extrapolação. Foram testados três modelos completamente preditivos com diferentes estruturas de representação (equações diferenciais, equações diferenciais provindas de taxas e conjuntos de reações). Foi utilizado dados de programação genética da fermentação de *Saccharopolyspora erythraea*. Os modelos com formas matemáticas análogas para balanço de massa interno e relações estequiométricas apresentaram resultados superiores, embora nenhum conhecimento prévio desta fermentação tenha sido utilizado.

12. MODELAGEM NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A pesquisa operacional, nos últimos tempos, tem desenvolvido uma grande variedade de modelos e algoritmos de otimização para a resolução de problemas em diversas áreas como logística, telecomunicações, produção, entre outras (IGNÁCIO & FILHO, 2004).

Durante a última década, houve um crescimento da aplicação de métodos físicos computacionais para SSF. Isto envolve a modelagem e simulação no crescimento microbiano, bem como transferências de calor e massa que variam de microescala à escala industrial. Este impacto teve um resultado positivo por estar baseado em princípios básicos de uma tecnologia antiga e em recentes progressos na bioengenharia industrial. Modelos de desempenho de biorreatores, novas técnicas para cartografia e biomonitoramento, são parâmetros de otimização usados em métodos estatísticos e heurísticos para controle de processos (LENZ et al., 2004).

A modelagem matemática representou um papel importante no que se refere a projetos de biorreatores de SSF (MITCHELL et al., 2003). Porém, LENZ et al. (2004) mencionam que, ao combinar e concentrar técnicas físicas modernas e

computacionais, é necessário grande atenção, de maneira a permitir a validação de modelos confiáveis e assim ter um progresso adicional nos processos de SSF.

SMITS *et al.* (1999) descrevem em seu estudo modelos matemáticos para avaliar os efeitos da cinética de inativação da biomassa fúngica por SSF utilizando bandejas. Os pesquisadores ainda afirmam que os modelos, nos quais a inativação ocorre para baixas taxas específicas de crescimento, podem prever a inativação da biomassa em combinação com um aumento rápido e uma posterior diminuição da temperatura. Tal inativação também pode acontecer quando o substrato está limitado ou produtos em concentrações tóxicas são formados.

CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O presente trabalho foi desenvolvido em quatro etapas, onde foram elaborados 4 artigos:

- **ARTIGO I** - Modelagem, otimização numérica e validação experimental da produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando fermentação em estado sólido;
- **ARTIGO II** - Modelagem e otimização numérica da produção de lipase por fermentação em estado sólido utilizando o fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus*;
- **ARTIGO III** - Produção e otimização de biossurfactante por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais como substrato;
- **ARTIGO IV** - Produção de lipase por fermentação em estado sólido utilizando resíduos da indústria arroseira como substrato.

ARTIGO I:

**MODELAGEM, OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA E VALIDAÇÃO
EXPERIMENTAL DA PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTE POR *Aspergillus fumigatus*
UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

MODELAGEM, OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Aspergillus fumigatus* UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Short title: Modelagem da Produção de Biossurfactante

Laboratório de Engenharia bioquímica, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Caixa postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil, Telefone: +55(53)3233-8653, e-mail: dqmjorge@furg.br

Resumo: A utilização de modelos matemáticos em processos biotecnológicos pode ser uma alternativa no que se refere à estimativa prévia de resultados, podendo desta forma prever a influência das variáveis mais significativas, dentro das faixas estudadas. O presente trabalho teve por objetivo modelar, otimizar e validar experimentalmente a produção por fermentação em estado sólido de biossurfactante com o fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* utilizando diferentes condições nutricionais. O modelo matemático foi obtido usando o tempo e a aeração do meio de fermentação como variáveis de controle, cujos resultados experimentais de Atividade Emulsificante foram ajustados à função quadrática pelo Método dos Mínimos Quadrados. Os experimentos sem fonte adicional de carbono e com óleo diesel apresentaram os melhores coeficientes de determinação para os ajustes polinomiais (0,912 e 0,858, respectivamente). Os resultados estimados comparados com os experimentais mostraram faixas estatisticamente iguais ($p < 0,05$) e as Atividades Emulsificante encontradas na otimização dos modelos sem fonte adicional de carbono e óleo diesel foram, respectivamente, $8,03 \text{ UE.g}^{-1}$ em 104h e $7,85 \text{ UE.g}^{-1}$ em 111h.

Palavras chave: *Aspergillus fumigatus*, biossurfactante, fermentação em estado sólido, modelagem.

Abstract: The utilization of mathematical models in biotechnological processes can be an alternative when it is referred to the previous estimation of results, and in this way, it can predict the influence of the most significant variants within the studied tracks. This work has as purpose to model, to optimize and to experimentally validate the biosurfactant solid-state fermentation production with the fungal *Aspergillus fumigatus* using different nutritional conditions. The mathematical model was obtained using the time and the aeration of the environment of fermentation as variants of control, of which experimental results of Emulsificant Activity were adjusted to the quadratic function by the Method of the Square Minima. The experiments without the carbon extra source and with diesel oil presented the best coefficients of determination to the polynomial adjusts (0,912 e 0,858, respectively). The predicted results compared to the experimental ones showed statistically equal tracks ($p < 0,05$) and the Emulsificant Activities found in the optimization of the models without carbon and diesel oil extra sources were, respectively, $8,03 \text{ UE.g}^{-1}$ in 104h and $7,85 \text{ UE.g}^{-1}$ in 111h.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, biosurfactant, solid-state fermentation, modelling.

1. Introdução

Biossurfactantes são compostos anfipáticos capazes de diminuir a tensão superficial e interfacial entre dois líquidos (VAN DYKE *et al.*, 1991). São macromoléculas, total ou parcialmente extracelulares (BICCA *et al.*, 1999), produzidos por microrganismos capazes de crescerem em substratos insolúveis em água (INOH *et al.*, 2003). Sua maior produção depende do substrato utilizado para produção, do crescimento microbiano e da linhagem (KARANTH *et al.*, 1999). Os biossurfactantes possuem características importantes frente aos surfactantes sintéticos, tais como a alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução de tensão superficial, solubilidade em água alcalina, estabilidade térmica, resistência a altas concentrações salinas e estabilidade quanto a variações de pH (KIM *et al.*, 1997). Estas características permitem a sua utilização em diversos setores industriais (BANAT *et al.*, 2000).

A utilização de biossurfactante tem sido cada vez mais aceita no mercado devido a sua vasta aplicação, podendo ser utilizado em diversas áreas, como é o caso das indústrias de alimentos, farmacêutica, cerâmica, papel, metal, tratamento de efluentes, dentre outras (CAMEOTRA & MAKKAR, 2004). As aplicações mais promissoras são as de limpeza de óleo em tanques de navios e biorremediação em derramamento de óleos e petróleo (FROST & SULLIVAN, 2002).

A modelagem de sistemas tem desenvolvimento paralelo ao avanço do conhecimento, chegando alguns autores a afirmar que o progresso da ciência está associado ao avanço das técnicas de elaboração de modelos e equações que descrevam o fenômeno ou processo (STRACK, 1984).

Segundo MATURA *et al.*, (2004), os modelos matemáticos de otimização têm duas formas gerais de uso. Na primeira, o modelo é usado ao nível estratégico, implicando em uma resolução do problema a intervalos de tempo consideravelmente longos, o que é intrínseco em uma decisão estratégica. Na segunda, o modelo atende a uma necessidade ao nível tático-operacional e os modelos de solução são usados periodicamente.

Nos últimos anos, têm sido desenvolvida uma grande variedade de modelos de otimização em diversas áreas (IGNÁCIO & FILHO, 2004). Esta técnica é usada há vários anos em bioprocessos, envolvendo o uso de modelos para monitoramento e controle da produção industrial (HODGSON *et al.*, 2004).

A modelagem matemática representou um papel importante no que se refere a projetos de biorreatores de fermentação em estado sólido (SSF) (MITCHELL *et al.*, 2003). Isto se verifica pelo crescimento da aplicação de métodos computacionais em SSF, envolvendo modelagem e simulação no crescimento microbiano, bem como

transferências de calor e massa que variam de microescala à escala industrial. Este impacto teve um resultado positivo por estar baseado em princípios básicos de uma tecnologia antiga e em recentes progressos na bioengenharia industrial. A combinação de técnicas físicas modernas e computacionais requer cuidados, de maneira a permitir a validação de modelos confiáveis e assim ter um progresso adicional na bioengenharia (LENZ *et al.*, 2004). Apesar da grande importância da modelagem nos sistemas de SSF, precisa ser estudado em detalhes, principalmente por causa das dificuldades envolvidas na medida dos parâmetros de crescimento, análise de crescimento celular e determinação de consumo de substrato, entre outros, causado pela complexidade da natureza estrutural e nutricional do substrato (PANDEY, 2003).

O presente trabalho teve por objetivo modelar, otimizar e validar experimentalmente a produção de biosurfactante por fermentação em estado sólido com *Aspergillus fumigatus* utilizando diferentes condições nutricionais em biorreatores de coluna com leito fixo.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismo

Para a realização dos experimentos foi utilizada a cepa do fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, cedido pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP). O microrganismo foi mantido a 4°C em tubos de ensaio, com ágar batata-dextrose (PDA) adicionados de 1% de glicerina.

2.2. Descrição do sistema

Os cultivos foram conduzidos no sistema descrito por HASAN *et al.*, 1998. As fermentações realizadas em biorreatores de coluna encamisada, com dimensões internas de 50 mm de diâmetro e 250 mm de altura, com leito fixo, mantidas a 30°C durante 144h. O ar fornecido por bombas de diafragma foi filtrado, umidificado e transferido para o eliminador de gotas, com o objetivo de manter a umidade do ar constante. A injeção de ar de cada experimento foi controlada através de rotâmetros instalados na base de cada biorreator. O esquema do experimento está representado na Figura 1.

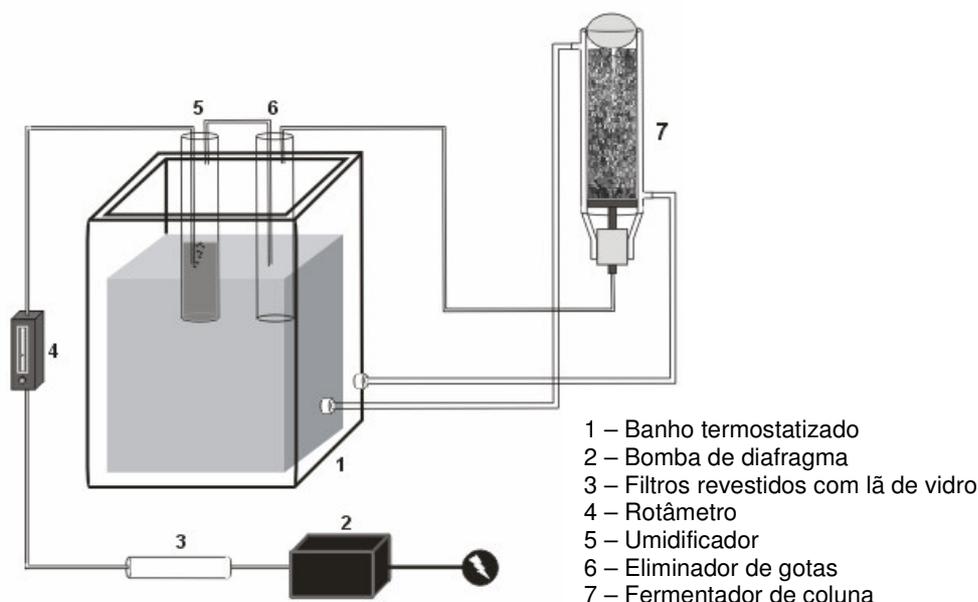


Figura 1. Esquema de fermentação em estado sólido com biorreatores de coluna.

O meio de cultivo foi composto por casca e farelo de arroz. O farelo foi moído em moinho de facas, utilizando malha de 1mm. Após a moagem, o farelo foi peneirado e as partículas retidas entre as peneiras 35 e 32 da série Tyler (0,42 e 0,50 mm, respectivamente) foram coletadas. Além da casca e do farelo de arroz, também fez parte do meio fermentativo uma solução de nutrientes composta por (g.L⁻¹): MgSO₄.7H₂O (0,5), NaNO₃ (3,0), KH₂PO₄ (1,0), extrato de levedura (1,0) e peptona (0,3).

Óleo diesel foi adicionado na proporção de 1% (w/w) como fonte adicional de carbono, para posterior comparação com experimentos sem a sua adição. Além de cultivos sem alimentação de ar, foram avaliadas cinco aerações: 40, 60, 100, 120 e 200 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹.

2.3. Análises envolvidas

2.3.1. Extração do Biossurfactante

A extração do biossurfactante foi realizada utilizando água destilada na proporção 1:5 (uma parte de soluto para cinco partes de solvente). Após a adição do solvente, as amostras foram submetidas à agitação em Shaker a 160 rpm e 50°C por 30 min. A seguir, as amostras foram filtradas a vácuo, obtendo o extrato para a avaliação da atividade emulsificante.

2.3.2. Medida da Atividade Emulsificante

A medida de Atividade Emulsificante foi realizada segundo a metodologia descrita por JOHNSON *et al.*, 1992. O filtrado proveniente da extração do biossurfactante juntamente com água destilada e óleo de soja foram agitados durante 1 min, deixando em repouso por 60 min e posteriormente submetidos à leitura em espectrofotômetro a 610 nm. A atividade emulsificante foi expressa em Unidades Emulsificantes (UE.g⁻¹) definida como a massa de biossurfactante necessária para aumentar a absorbância em 1,0 unidade à 610nm, quando comparado com o branco.

A unidade de cada amostras foi determinada segundo a metodologia da AOAC (1995), para posterior conversão dos resultados para base seca.

2.4. Desenvolvimento dos modelos

Testes preliminares foram realizados utilizando diferentes funções matemáticas, visando obter o modelo que melhor se ajustasse aos valores experimentais, medidos pelos coeficientes de determinação.

Os coeficientes das equações foram reparametrizadas em função de diferentes equações e calculados numericamente pelo método de mínimos quadrados, sendo os resultados experimentais e preditos avaliados estatisticamente por análise de variância univariada, para verificar diferenças significativas.

2.5. Otimização

Para cada condição de aeração estudada foram coletados os resultados ótimos de Atividade Emulsificante, obtidos através dos experimentos e dos modelos. Os resultados foram maximizados em relação à aeração para determinação das condições que apresentam as melhores respostas de produção de biossurfactante. Para isso foram gerados 2 Planejamentos Compostos Centrais (PCC), um para cada condição nutricional utilizada (sem fonte adicional de carbono e óleo diesel).

Os melhores resultados de aeração (estimados), bem como seus correspondentes tempos de fermentação foram usados como pontos centrais. Os níveis inferior (-1) e superior (+1) utilizados foram 20 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ e 24h a menos e a mais que os respectivos pontos centrais.

2.6. Validação dos modelos

A validação dos modelos foi feita experimentalmente usando Planejamento Fatorial 2², com duplicata no ponto central. Os melhores resultados preditos bem como

seus correspondentes tempos de fermentação foram usados como pontos centrais. Os níveis (-1) e (+1) utilizados foram os mesmos do item 2.5.

3. Resultados e Discussão

Na Figura 2, são apresentados os resultados de Atividade Emulsificante para os experimentos utilizando diferentes aerações e condições nutricionais. Com exceção do experimento utilizando $40 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, os melhores resultados foram encontrados na ausência de fonte adicional de carbono, mostrando a possibilidade de minimizar custos de produção, bem como o aumento da eficiência do processo fermentativo estudado. COOPER (1986) descreve que, além do grande número de microrganismos produtores de biossurfactantes, diversos são os substratos alternativos com potencial para este fim. LEVIŠAUSKAS *et al.*, (2004) assumem que a concentração de carbono, nitrogênio e fontes de nutrientes específicos para taxa de crescimento celular são os mais importantes fatores que influenciam a biossíntese de biossurfactante.

SULLIVAN (1998) explica que a regulação da produção do biossurfactante apresenta um complicado mecanismo, porém, a presença de hidrocarboneto no meio, onde a densidade da célula do microrganismo é presumivelmente mais baixa, induz sua produção. É possível que outros fatores reguladores, ativados por condições ambientais diferentes, tal como disponibilidade de nitrogênio e nível de AMP cíclico, anule parte do mecanismo de produção, podendo, um destes motivos, ter ocasionado a inibição da produção de biossurfactante na condição em que foi utilizado óleo diesel como fonte adicional de carbono.

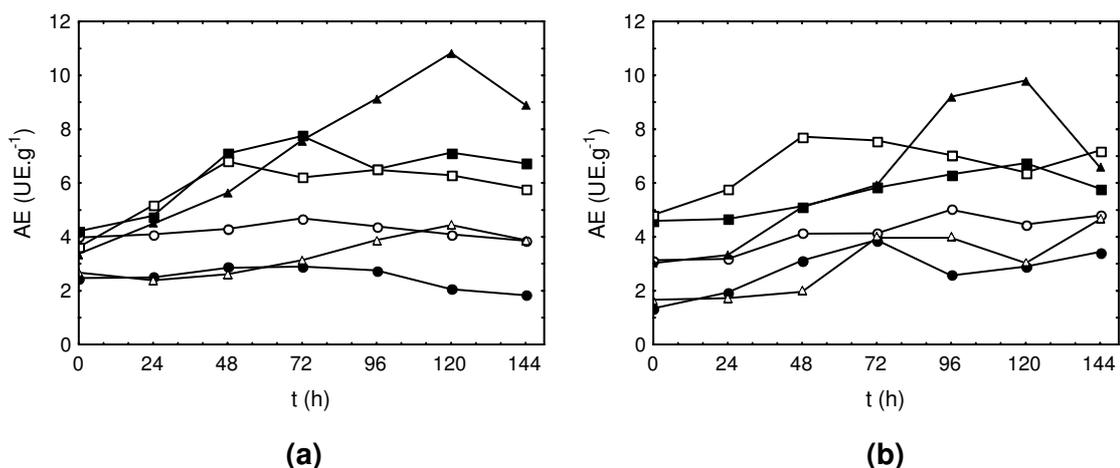


Figura 2. Perfil de Atividade Emulsificante (AE) em função do tempo de fermentação (t) para os experimentos utilizando 0 (●), 40 (○), 60 (■), 100 (□), 120 (▲) e 200 $\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (△), (a) sem fonte adicional de carbono e (b) adicionados de óleo diesel.

A análise estatística dos resultados de Atividade Emulsificante mostrou que a aeração influenciou significamente ($p < 0,05$) na produção de biossurfactante no decorrer do tempo de fermentação, sendo desta forma as duas variáveis utilizadas para a elaboração dos modelos matemáticos.

3.1. Modelagem Numérica

O ajuste polinomial foi aquele que mais se aproximou dos valores experimentais. Polinômios de grau mais elevados também foram testados, mas apesar de terem apresentado altos coeficientes de determinação, foi observado que os modelos apresentavam oscilação nos resultados gerados, impossibilitando a confiabilidade dos resultados e, conseqüentemente, a otimização do processo de produção do biossurfactante. Optou-se, então, por utilizar ajustes polinomiais de segunda ordem, de forma que os resultados acompanhassem a tendência dos valores experimentais, conforme descrito na Equação 1. No ajuste polinomial foram calculados os coeficientes C1, C2 e C3, bem como os valores de R^2 para cada curva. Os valores de R^2 encontrados permaneceram entre 0,782 e 0,912. Os resultados dos coeficientes do polinômio bem como seus coeficientes de determinação são mostrados na Tabela 1.

$$AE = C1 + C2.t + C3.t^2 \qquad \text{Equação 1}$$

Onde

AE: Atividade Emulsificante durante a produção de biossurfactante ($UE.g^{-1}$);
C1, C2 e C3: coeficientes da Equação 1.

Tabela 1. Coeficientes C1, C2 e C3, referentes à Equação 1, obtidos através do ajuste polinomial dos resultados experimentais da produção de biossurfactante por SSF sem fonte adicional de carbono e óleo diesel.

FAC	Vazão de ar ($\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Coeficientes do polinômio			R^2
		C1	C2	C3	
Sem FAC	0	2,387	1,620 E-2	-1,428 E-4	0,876
	40	3,895	1,646 E-2	-1,170 E-4	0,810
	60	4,044	6,838 E-2	-3,540 E-4	0,811
	100	3,823	6,489 E-2	-3,639 E-4	0,890
	120	2,833	8,839 E-2	-2,753 E-4	0,912
	200	2,374	1,113 E-2	0,153 E-4	0,782
Óleo Diesel	0	1,410	3,708 E-2	-1,785 E-4	0,652
	40	2,969	2,507 E-2	-0,870 E-4	0,858
	60	4,279	3,045 E-2	-1,190 E-4	0,809
	100	4,956	5,454 E-2	-2,982 E-4	0,692
	120	2,065	9,649 E-2	-3,836 E-4	0,755
	200	1,412	2,662 E-2	-0,444 E-4	0,731

R^2 : Coeficiente de determinação; FAC: Fonte adicional de carbono.

Na Figura 3 são comparados dois exemplos de resultados experimentais e ajustados, para as condições sem fonte adicional de carbono na ausência de aeração e com óleo diesel utilizando $100 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

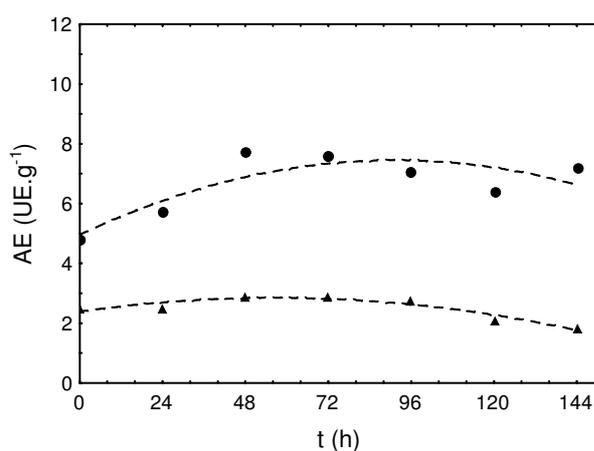


Figura 3. Comparação entre os resultados (—) experimentais e (.....) ajustados para os experimentos (▲) sem a utilização de fonte adicional de carbono e sem aeração e (●) utilizando óleo diesel com aeração de $100 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Para obtenção do modelo, o conjunto de valores de cada coeficiente (C1, C2 e C3), apresentado na Tabela 1, foi ajustado a uma reta (Equação 2, 3 e 4), sendo esta dependente de uma outra função, denominada função Z (Equação 5).

$$C1 = B1 + B2.Z \quad \text{Equação 2}$$

$$C2 = B3 + B4.Z \quad \text{Equação 3}$$

$$C3 = B5 + B6.Z \quad \text{Equação 4}$$

Onde

$$B1, B3 \text{ e } B5: B_i$$

$$B2, B4 \text{ e } B6: B_j$$

$$Z = \text{sen}(a1 \cdot \log(a2 \cdot V)) \quad \text{Equação 5}$$

Para a obtenção da função Z, parametrizada em relação à aeração (V , $\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), os parâmetros $a1$ e $a2$ foram variadas entre os valores 0,01 e 5. Assim, o par ($a1$, $a2$) que apresentou o maior valor para o coeficiente de determinação foi escolhido. Na Tabela 2 são mostrados os coeficientes B_i e B_j , referente à Equação 2, juntamente com os parâmetros $a1$ e $a2$ da função parametrizada Z (Equação 3).

Tabela 2. Coeficiente (B_i e B_j) e parâmetros ($a1$ e $a2$) usados nas Equações 2 e 3.

FAC	Coeficientes	B_i	B_j	$a1$	$a2$	R^2
Sem FAC	C1	3,219	-0,932	2,25	2,32	0,934
	C2	-0,024	0,107	1,50	2,14	0,900
	C3	-0,174 E-3	-0,238 E-3	2,66	2,57	0,999
Óleo diesel	C1	3,228	-1,875	3,37	2,37	0,820
	C2	0,047	0,031	3,75	2	0,784
	C3	-0,198	-0,155	3,99	1,57	0,928

FAC: Fonte adicional de carbono; R^2 : Coeficiente de determinação.

Os valores dos coeficientes de determinação para função linear parametrizada (entre 0,900 e 0,999), mostrados na Tabela 2, indicam um bom ajuste à função trigonometria utilizada. Na Figura 4, são mostradas as curvas do modelo, simulando vazões de 50, 80 110 $\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ sem fonte adicional de carbono.

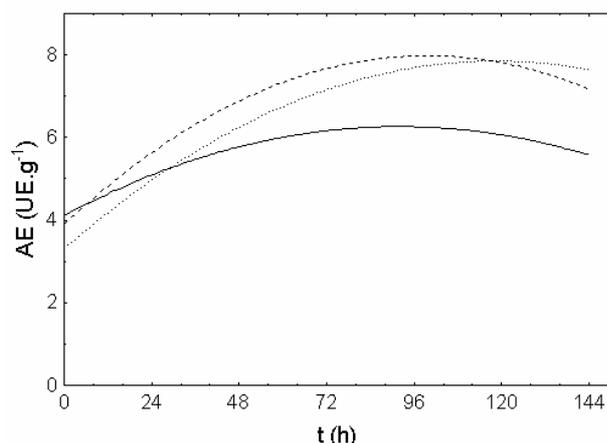


Figura 4. Atividade Emulsificante, obtidas a partir do modelo desenvolvido, em função do tempo de fermentação utilizando vazões de ar de (—) 50, (----) 80 e (.....) 110 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ sem a utilização de fonte adicional de carbono.

Através da Figura 4 verifica-se a influência da aeração nos resultados de Atividade Emulsificante gerados a partir do modelo elaborado. Com estes resultados é possível calcular o tempo ideal para o término da fermentação, de modo a obter a maior Atividade Emulsificante. Para as aerações exemplificadas na Figura 4 tem-se que os tempos ótimos foram 92, 100 e 118h para os ensaios com 50, 80 e 110 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹, respectivamente. Estudos realizados por VEENANADIG *et al.*, (2000), utilizando biorreatores de coluna com *Bacillus subtilis* FE-2 em leito fixo, mostram o efeito da aeração na produção de biossurfactante em SSF, encontrando melhores resultados com maiores aerações. Os autores explicam que o aumento da transferência de oxigênio, resultou em uma fermentação mais eficiente, aumentando consequentemente a produção de biossurfactante. HONGZHANG *et al.*, (2002) mencionam que o fornecimento de ar também está relacionado com a atividade metabólica do microrganismo. Porém, se a taxa for muito elevada, a umidade do meio de cultivo é reduzida.

Os resultados preditos de Atividade Emulsificante, referentes às suas respectivas aerações, foram submetidos à análise de variância. Assim como os resultados experimentais, estes apresentaram diferenças significativas ($p < 0.05$). Além desta diferença foi possível observar a existência de um valor máximo para Atividade Emulsificante em cada condição de aeração, surgindo a possibilidade de otimizar o processo.

3.2. Otimização Numérica

Para otimização do processo de produção de lipase foi usado PCC com os níveis de variação mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Níveis dos Planejamentos Compostos Centrais (PCC) utilizados na otimização numérica da produção de lipase para cada condição de fonte adicional de carbono (óleo diesel e sem fonte).

Experimentos	Variável	- α	- 1	0	+ 1	+ α
Sem FAC	X_1	61,72	70	90	110	118,28
	X_2	70,06	90	104	118	137,80
Óleo diesel	X_1	71,72	80	100	120	128,28
	X_2	77,06	87	111	135	144,94

X_1 : Aeração ($\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); X_2 : Tempo de fermentação (h); FAC: Fonte adicional de carbono.

Na Figura 5 são mostrados as curvas de contorno dos resultados preditos proveniente do Planejamento Composto Central. Os valores demonstram a possibilidade da minimização dos custos de produção do biossurfactante, uma vez que os melhores resultados foram encontrados nos experimentos sem fonte adicional de carbono, com vazão de ar inferior aos adicionados de óleo diesel.

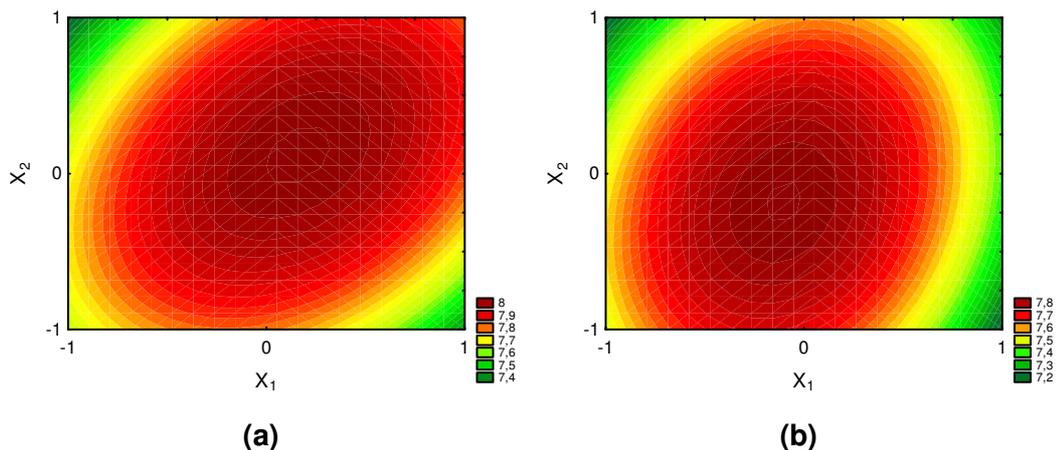


Figura 5. Curvas de contorno obtidas do Planejamento Composto Central para a otimização dos resultados preditos (a) sem fonte adicional de carbono e (b) óleo diesel.

Poucos são os estudos voltados para otimização de condições específicas que envolvem comportamento experimental e métodos matemáticos para resolução de problemas. Alguns estudos envolvem a utilização de metodologias complexas para a otimização de processos de produção, como é o caso de modelos elaborados por JIA *et al.*, (2006) e LEVIŠAUSKAS *et al.*, (2004).

3.3. Validação dos modelos

Os resultados preditos foram maximizados em função da aeração e comparados com os valores experimentais, apresentando resultados bastante próximos. Na Figura 6 estão mostrados os resultados da otimização, numérica e experimental, da Atividade Emulsificante em seus respectivos tempos de fermentação.

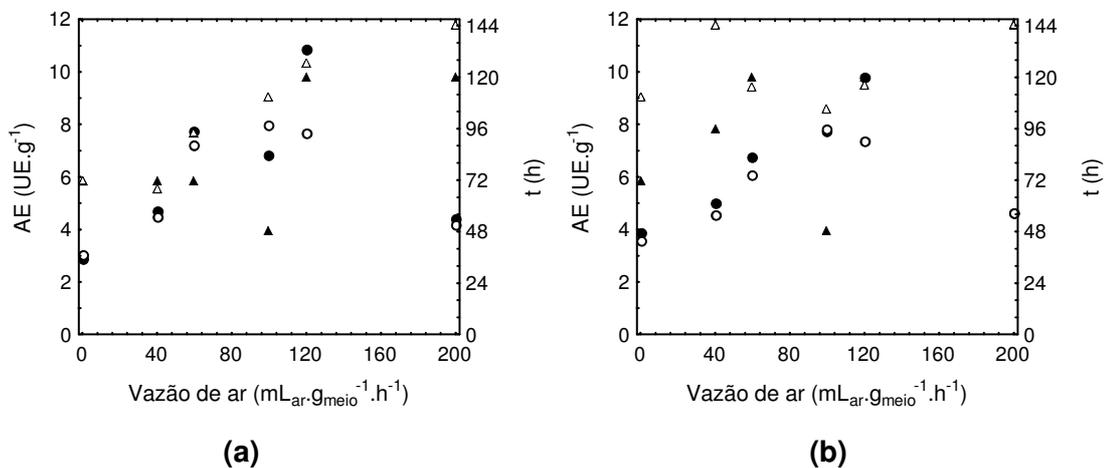


Figura 6. Atividades Emulsificante (●) experimentais e (○) estimados para seus respectivos (▲ e △) tempo de fermentação, utilizando substratos (a) sem fonte adicional de carbono e (b) óleo diesel.

Na Figura 6 observa-se os máximos encontrados para a produção de biossurfactante referente aos experimentos sem fonte adicional de carbono forneceu resultado de 8,03 UE.g⁻¹ nas condições de 90 mL.ar.gmeio⁻¹.h⁻¹ e 104h de fermentação. Já para o modelo utilizando óleo diesel, foi encontrado 7,85 UE.g⁻¹ em 100 mL.ar.gmeio⁻¹.h⁻¹ e 111h de fermentação.

Conforme a Figura 7 pode-se verificar que os resultados de Atividade Emulsificante referentes à otimização numérica e ao Planejamento Fatorial dos experimentos, foram, respectivamente, 8,52 e 8,67 UE.g⁻¹ (sem fonte adicional de carbono) e 9,72 e 6,85 UE.g⁻¹ (utilizando óleo diesel).

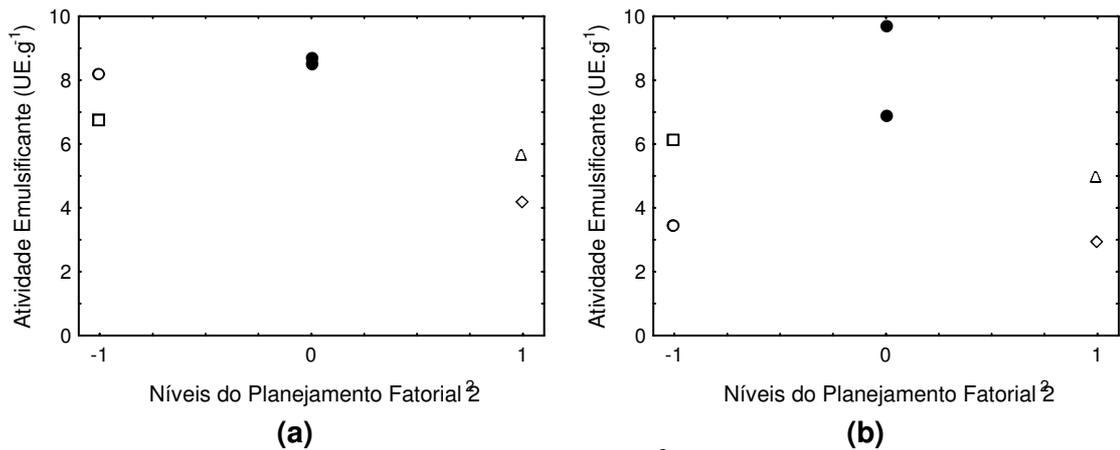


Figura 7. Resultados do Planejamento Fatorial 2² utilizando os níveis de aeração e tempo de fermentação (o) -1 e -1, (□) +1 e -1, (•) pontos centrais, (△) -1 e +1, (◇) +1 e +1, respectivamente, para os experimentos (a) sem fonte adicional de carbono com e (b) óleo diesel.

Assim como os resultados preditos o experimento sem fonte adicional de carbono apresentou as maiores Atividades Emulsificante, mostrando que o modelo desenvolvido responde corretamente ao processo em estudo mesmo quando variando as condições experimentais.

4. Conclusões

Os melhores resultados experimentais de Atividade Emulsificante foram encontrados na ausência de fonte adicional de carbono, exceto para o experimento utilizando 40 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹. A otimização numérica da produção de biossurfactante referente aos experimentos sem fonte adicional de carbono apresentou Atividade Emulsificante 8,03 UE.g⁻¹ nas condições de 90 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ e 104h de fermentação. Já para o modelo utilizando óleo diesel, foi encontrado 7,85 UE.g⁻¹ em 100 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ e 111h de fermentação. Os resultados foram validados experimentalmente, apresentaram, respectivamente, 8,52 e 8,67 UE.g⁻¹ (sem fonte adicional de carbono) e 9,72 e 6,85 UE.g⁻¹ (utilizando óleo diesel).

O modelo confeccionado se mostrou eficiente para representar o processo de produção de biossurfactante, mostrando que a utilização de modelos polinomiais parametrizados é uma ferramenta importante para prever antecipadamente a produção de biossurfactante por fermentação em estado sólido utilizando *Aspergillus fumigatus*.

5. Referências Bibliográficas

AOAC. **Official Methods of Analysis of International**. 16th Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.

BANAT, I. M., MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S. S. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, 53, p.495-508, 2000.

BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**. v. 30, p. 231–236, 1999.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**. v. 7, p. 262–266, 2004.

COOPER, DG. Biosurfactants. **Microbiological Sciences**. v. 3, n. 5, p. 145-149, 1986.

FROST & SULLIVAN. Market Forecast: Microbial Biosurfactants. **Industrial Bioprocessing**. p. 1, 2002

HASAN, S. D. M.; COSTA, J. A. V.; SANZO, A. V. L. Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnology Techniques**. v. 12, n. 10, p. 787–791, 1998.

HODGSON, B. J.; TAYLOR, C. N.; USHIO, M.; LEIGH, J. R.; KALGANOVA, T.; BAGANZ, F. Intelligent modelling of bioprocesses: a comparison of structured and unstructured approaches. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 26, n. 6, p. 353-359, 2004.

HONGZHANG, C.; FUJIAN, X.; ZHONGHOU, T.; ZUOHU, L. A Novel Industrial-Level Reactor with Two Dynamic Changes of Air for Solid-State Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 93, n. 2, p. 211-214, 2002.

INOH, Y.; KITAMOTO, D.; HIRASHIMA, N.; NAKANISHI, M. Biosurfactant MEL-A dramatically increases gene transfection via membrane fusion. **Journal of Controlled Release**. v. 94, p. 423–431, 2003.

IGNÁCIO, A. A. V.; FILHO, V. J. M. F. O uso de software de modelagem AIMMS na solução de problemas de programação matemática. **Pesquisa Operacional**. v. 24, n.1, 2004.

JIA, X.; ZHANG, T.; WANG, F.; HAN, F. Multi-objective modeling and optimization for cleaner production processes. **Journal of Cleaner Production**. v. 14, p. 146-151, 2006.

JOHNSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; SISTA, V.; YADAV, N. K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **Biotechnology Letters**. 14, 6, 487-490, 1992.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Bangalore: Current Science**. v. 77, n. 1, p. 116-126, 1999.

KIM, S. G.; LIM, E. J.; LEE, S. O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L – 417. **Biotechnology Applied Biochemistry**. v. 31, p. 249-253, 1997.

LENZ, J.; HÖFER, M.; KRASENBRINK, J.-B.; HÖLKER, U. A survey of computational and physical methods applied to solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 65, p. 9–17, 2004.

LEVIŠAUSKAS, D.; GALVANAUSKAS, V.; ŽUNDA, G.; GRIGIŠKIS, S. Model-based optimization of biosurfactant production in fed-batch culture *Azotobacter vinelandii*. **Biotechnology Letters**. v. 26, p. 1141-1146, 2004.

MATURA, A.; FERRER, J.C. & BARAÑAO, F. Design and implementation-based decision support system generator. **European Journal of Operational Research**. v. 154, p. 170-183, 2004.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, B.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. v. 68, p. 61-138, 2003.

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

STRACK, J. GPSS: **Modelagem e simulação de sistemas**. Editora Livros Técnicos e Científicos. 174 p., Rio de Janeiro, 1984.

SULLIVAN, E. R. Molecular genetics of biosurfactant production. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 9, p. 263-269, 1998.

VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of Microbial Surfactants. **Biotechnology Advanced**. Vol. 9, p. 241-252, 1991.

VEENANADIG, N. K.; GOWTHAMAN, M. K.; KARANTH, N. G. K. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. **Bioprocess Engineering**. v. 22, p. 95-99, 2000.

ARTIGO II:

MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO O FUNGO FILAMENTOSO *Aspergillus fumigatus*

MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO O FUNGO FILAMENTOSO

Aspergillus fumigatus

Short title: Modelagem da produção de lipase

Laboratório de Engenharia bioquímica, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Caixa postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil, Telefone: +55(53)3233-8653, e-mail: dqmjorge@furg.br

Resumo: Este trabalho teve por objetivo modelar e otimizar a produção de lipase por fermentação em estado sólido com *Aspergillus fumigatus*, utilizando como substrato principal, subprodutos agroindustriais e diferentes fontes adicionais de carbono. Os modelos matemáticos foram obtidos usando a aeração do meio (0 a $200 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e o tempo de fermentação (0 a 144h), como variáveis de controle. A função objetivo que representa o acréscimo da concentração de enzima produzida pelo fungo foi otimizada fixando a aeração e calculando o tempo ótimo no qual a concentração de enzima máxima foi obtida em função do tempo. As Atividades Lipolítica obtidas na otimização numérica da produção de lipase foram $100,31 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ em 103h , $117,02 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ em 90h e $124,12 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ em 119h , respectivamente, para os experimentos sem fonte adicional de carbono, óleo de soja e óleo diesel.

Palavras chave: *Aspergillus fumigatus*, fermentação em estado sólido, lipase, modelagem.

Abstract: This work had as purpose to model and to optimize the lipase production by solid-state fermentation with *Aspergillus fumigatus*, using as substracts main, agro-industrial waste and different carbon extra sources. The mathematical models were obtained using the environment aeration (0 to $200 \text{ mL}_{\text{air}} \cdot \text{g}_{\text{substrate}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) and the fermentation time (0 to 144h), as variants of control. The objective function that represents the increase of enzyme concentration produced by the fungal was optimized fixing the aeration and calculating the time in which the maxim enzyme concentration was obtained considering the time. The Lipase Activities obtained in the numerical optimization of the lipase production were $100,31 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ in 103h , $117,02 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ in 90h and $124,12 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ in 119h , respectively, for the experiments without carbon, soybean oil and diesel oil extra source.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, solid-state fermentation, lipase, modeling.

1. Introdução

Mudanças significativas nos últimos anos foram feitas nos processos fermentativos em estado sólido (SSF). Estudos comparativos com os processos submersos mostram que os rendimentos e o potencial de recuperação de produtos são mais vantajosos nos processos de fermentação em estado sólido (PANDEY *et al.*, 1999).

Devido à capacidade de crescimento em baixos níveis de água no sistema de SSF, os fungos filamentosos têm recebido a maior parte das atenções nas pesquisas (HESSELTINE, 1972). *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.* e *Penicillium sp.* são alguns exemplos de fungos utilizados para obtenção de enriquecimento protéico e produção de lipase neste tipo de fermentação (BORZANI *et al.*, 2001, GOMBERT *et al.*, 1999, KAMINI *et al.*, 1998).

As lipases apresentam grande importância industrial em relação às demais enzimas, atuando na interface óleo-água como catalisadores, hidrolisando triglicerídios a glicerol e ácidos graxos livres (HATZINIKOLAOU *et al.*, 1996; CHRISTAKOPOULOS *et al.*, 1992). Apesar das lipases serem produzidas por um grande número de microrganismos, a utilização de fungos se destaca por apresentar produção normalmente extracelular, o que facilita sua extração (LONG *et al.*, 1996). As lipases também são capazes de catalisar reações de esterificação, transesterificação e lactonização (esterificação intramolecular), proporcionando diferentes especificidades em vários substratos existentes (GANDHI, 1997).

As lipases apresentam aplicações promissoras no setor alimentício, agroquímico, oleoquímico, farmacêutico, entre outras, proporcionando o crescimento de tecnologias para a síntese de novos compostos baseadas na sua utilização (LIESE *et al.*, 2000).

Uma das limitações do uso industrial das lipases é o seu custo (KANWAR *et al.*, 2002). Isto faz com que os estudos das técnicas de otimização contribuam para o aumento da produtividade dos processos de fermentação, bem como para diminuição do custo total de produção (CASTILHO *et al.*, 2000). Trabalhos de otimização da produção de lipase como os de PUTHLI *et al.*, (2006) e BURKERT *et al.*, (2004) são alguns exemplos de metodologias utilizadas para este fim.

Diversas fontes de carbono têm sido estudadas para a produção de lipase, pois existe um grande interesse em encontrar alternativas economicamente atrativas para a diminuição dos custos elevados (YOU LI *et al.*, 2004). A utilização de subprodutos da agroindústria como substrato em fermentação em estado sólido tem apresentado várias vantagens nos processos de produção (PANDEY *et al.*, 2000).

As lipases são sintetizadas na presença de indutores, dentre eles o farelo de trigo, farelo de arroz, dextrinas, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos oleosos (RIVERAMUNOZ *et al.*, 1991). BHUSHAN *et al.*, (1994) estudaram a produção de lipases por fermentação em estado sólido usando farelo de arroz e farelo de trigo como substratos alternativos, mostrando a possibilidade de minimizar custos na sua produção.

O método clássico de otimização de processos envolve a mudança de uma variável de cada vez, mantendo as demais com seus níveis fixos, gerando, conseqüentemente, grande número de experimentos (SEN, 1997). A modificação das condições fisiológicas e composição do meio de cultivo são algumas alternativas que vêm sendo estudadas para o aumento de produtividade. Recentes avanços na área de otimização destas condições estão resultando no aumento significativo na sua produção, o que é comercialmente atrativo (RODRIGUES *et al.*, 2006).

O presente trabalho teve por objetivo modelar e otimizar numericamente a produção de lipase a partir de fermentação em estado sólido com o fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos da indústria arroseira como substrato em diferentes condições de aeração e fontes adicionais de carbono.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismo

Para a realização dos experimentos foi utilizada a cepa do fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, cedido pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP). O microrganismo foi mantido a 4°C em tubos de ensaio, com ágar batata-dextrose (PDA) adicionados de 1% de glicerina.

2.2. Descrição do sistema

Os cultivos foram conduzidos no sistema descrito por HASAN *et al.*, 1998. As fermentações realizadas em biorreatores de coluna encamisada, com dimensões internas de 50 mm de diâmetro e 250 mm de altura, foram mantidas a 30 °C durante 144h. O ar fornecido por bombas de diafragma foi filtrado, umidificado e transferido para o eliminador de gotas, com o objetivo de manter a umidade do ar constante. A injeção de ar de cada experimento foi controlada através de rotômetros instalados na base de cada biorreator. O esquema do experimento está representado na Figura 1.

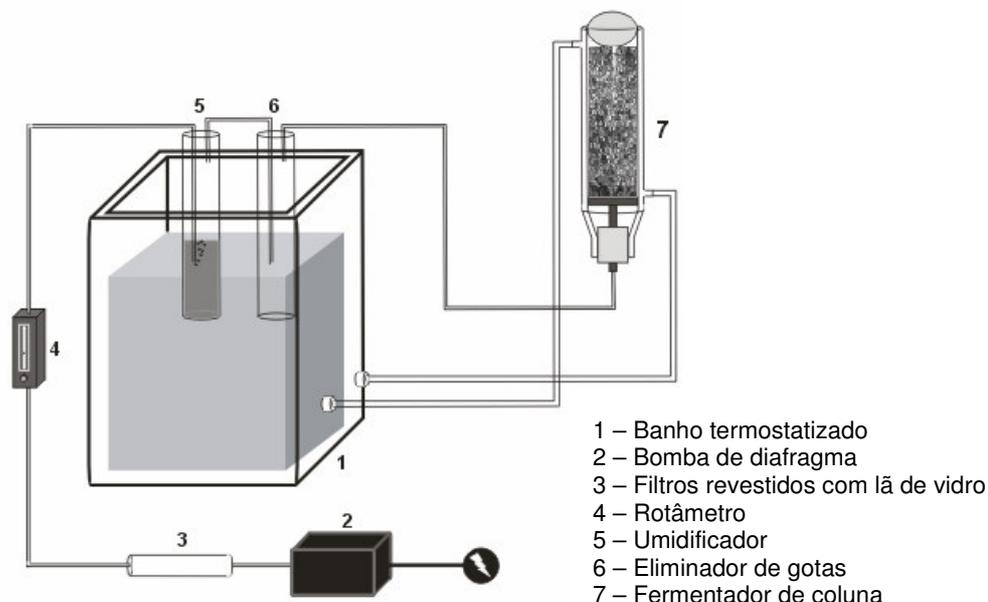


Figura 1. Esquema de fermentação em estado sólido com biorreatores de coluna.

O meio de cultivo foi composto por casca e farelo de arroz. O farelo foi moído em moinho de facas, utilizando malha de 1 mm. Após a moagem, o farelo foi peneirado e as partículas retidas entre as peneiras 35 e 32 da série Tyler (0,42 e 0,50 mm, respectivamente) foram coletadas. Além da casca e do farelo de arroz, também fez parte do meio fermentativo uma solução de nutrientes composta por (g.L⁻¹): MgSO₄.7H₂O (0,5), NaNO₃ (3,0), KH₂PO₄ (1,0), extrato de levedura (1,0) e peptona (0,3).

Óleo de soja e óleo diesel foram adicionados em experimentos separados, na proporção de 1% (p/p), como fonte adicional de carbono, para posterior comparação com experimentos sem a sua adição. Além de cultivos sem alimentação de ar, foram avaliadas aerações de 40, 50, 60, 70, 90, 110, 120 e 200mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹.

2.3. Atividade Enzimática

2.3.1. Extração da enzima

Para extrair a enzima foi utilizada solução tampão fosfato 50mM (pH 7,0), adicionada na proporção de 1g de meio fermentados para 10mL de solução tampão, mantidos sob agitação a 160 rpm e 37°C durante 30min e filtrada a vácuo em funil de Büchner, obtendo o extrato para a avaliação da Atividade Lipolítica.

2.3.2. Determinação da Atividade Lipolítica

A Atividade Lipolítica foi determinada segundo a metodologia descrita por MACEDO *et al.*, (1997). O método utiliza uma emulsão de óleo de oliva goma arábica. Os ácidos graxos liberados durante a reação da emulsão e o extrato enzimático foram titulados com NaOH 0,05N. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto.

A unidade de cada amostra foi determinada segundo a metodologia da AOAC (1995), para posterior conversão dos resultados para base seca.

2.4. Desenvolvimento dos modelos

Testes preliminares foram realizados utilizando diferentes funções matemáticas, sendo estas reparametrizadas em função de diferentes equações, para obtenção dos melhores ajustes, medidos pelos coeficientes de determinação.

Os coeficientes das equações foram calculados numericamente pelo método de mínimos quadrados, sendo os resultados experimentais e preditos avaliados estatisticamente por análise de variância univariada, para verificar diferenças significativas.

2.5. Otimização

Para cada condição de aeração estudada foram coletados os resultados ótimos de Atividade Lipolítica, obtidos através dos modelos. Os resultados foram maximizados em relação à aeração para determinação das condições que apresentam as melhores respostas de produção de lipase. Para isso utilizou-se 3 Planejamentos Compostos Centrais (PCC), um para cada condição nutricional utilizada (sem fonte adicional de carbono, óleo de soja e óleo diesel).

Os melhores resultados de aeração (estimados), bem como seus correspondentes tempos de fermentação foram usados como pontos centrais. Os níveis (-1) e (+1) utilizados foram $20\text{mL}_{\text{ar}}\cdot\text{g}_{\text{meio}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e 24h inferiores e superiores em relação aos respectivos pontos centrais.

3. Resultados e Discussão

3.1. Atividade Lipolítica

Na Figura 2 são mostrados os perfis de Atividade Enzimática para as aerações 80 e $120\text{mL}_{\text{ar}}\cdot\text{g}_{\text{meio}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, para cada condição nutricional utilizada. O fornecimento de $80\text{mL}_{\text{ar}}\cdot\text{g}_{\text{meio}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ apresentou pequena variação entre as atividades

enzimáticas, sendo o maior valor encontrado para o experimento com óleo diesel (84,05 U.g⁻¹ em 24h). Para a aeração 120 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ os experimentos adicionados de óleo de soja e óleo diesel apresentaram melhores resultados (107,16 em 120h e 108,30 U.g⁻¹ em 144h, respectivamente). Este comportamento foi verificado nos demais experimentos, mostrando que a fonte adicional de carbono apresentou um efeito sinérgico na produção da lipase, sendo os melhores resultados encontrados entre 70 e 120 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹.

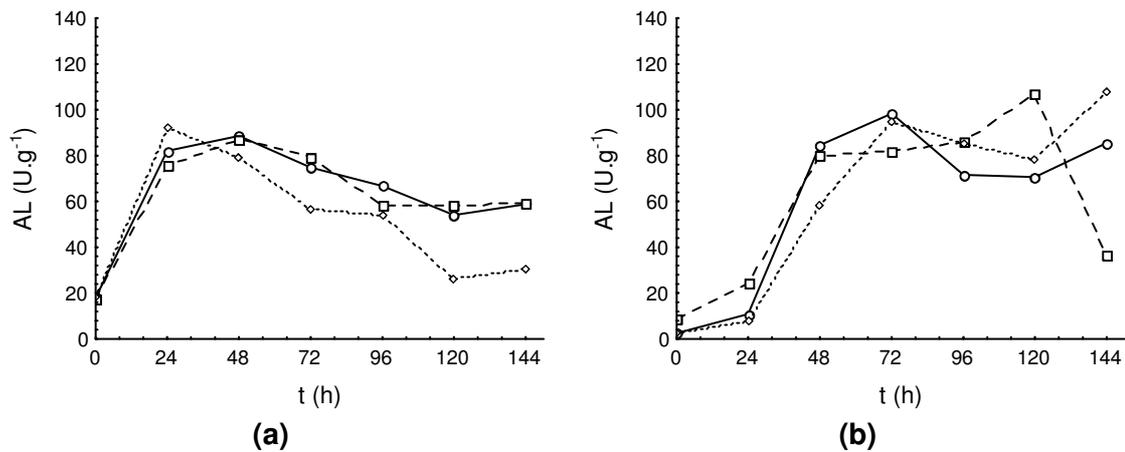


Figura 2. Resultados de Atividade Lipolítica (AL) em função do tempo de fermentação (t) para os experimentos utilizando (a) 80 e (b) 120 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ com (----) óleo de soja, (.....) óleo diesel e (—) na ausência de fonte adicional de carbono.

KAMINI *et al.*, (1998) também constataram que a adição de hidrocarbonetos no meio de cultivo favorece a produção da enzima.

Além das diferenças significativas ($p < 0,05$) encontradas para os valores de Atividades Lipolítica, nas aerações estudadas, o aumento da taxa de aeração favoreceu a esporulação do microrganismo, ocorrendo provavelmente o aumento da biomassa presente. Estudos realizados por HONGZHANG *et al.*, (2002) mostraram que o aumento do fornecimento de ar favorece a atividade metabólica do microrganismo. Porém, para aerações elevadas, a umidade do meio de cultivo pode ser reduzida. PUTHLI *et al.*, (2006) e ELIBOL & OZER, (2000) observaram que altas concentrações de oxigênio podem diminuir a produção de lipase e afetar o crescimento celular.

3.2. Modelagem Matemática

Os dados experimentais foram ajustados a polinômios de 2º grau em função do tempo de fermentação (t), com coeficientes variáveis, conforme descrito na Equação 1.

$$AL = Ca + Cb.t + Cc.t^2 \quad \text{Equação 1}$$

Onde

AL: Atividade Lipolítica durante a produção de lipase (U.g⁻¹);

Ca, Cb e Cc: coeficientes da Equação 1.

O conjunto de resultados experimentais, ajustados aos polinômios (Equação 1), apresentaram coeficientes de determinação (R²) entre 0,716 e 0,891, para os experimentos sem fonte adicional de carbono, como é mostrado na Tabela 1. Testes preliminares foram realizados utilizando polinomiais de grau mais elevados, porém os modelos apresentavam oscilação nos resultados gerados, impossibilitando a confiabilidade dos resultados e conseqüentemente a otimização do processo de produção da lipase. Com isso se optou por utilizar ajustes polinomiais de segunda ordem, de forma que os valores preditos acompanhassem a tendência dos valores experimentais.

Tabela 1. Coeficientes do polinômio de segunda ordem e seus coeficientes de determinação gerados a partir do ajuste para os experimentos sem fonte adicional de carbono.

Vazão de ar (mL _{ar} ,g _{meio} ⁻¹ ,h ⁻¹)	Coeficientes do polinômio			R ²
	Ca	Cb	Cc	
0	36,302	1,395	-0,007	0,717
40	21,546	1,483	-0,008	0,825
60	0,529	1,859	-0,009	0,802
70	3,927	1,989	-0,010	0,734
90	10,742	1,724	-0,009	0,835
110	9,787	2,050	-0,010	0,891
120	-2,633	1,785	-0,009	0,763
200	43,506	0,801	-0,003	0,716

R²: Coeficiente de determinação

Na Figura 3 é mostrada a comparação dos resultados provenientes do ajuste polinomial e os valores experimentais para as condições 40 e 110 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹, sem fonte adicional de carbono e óleo diesel, respectivamente.

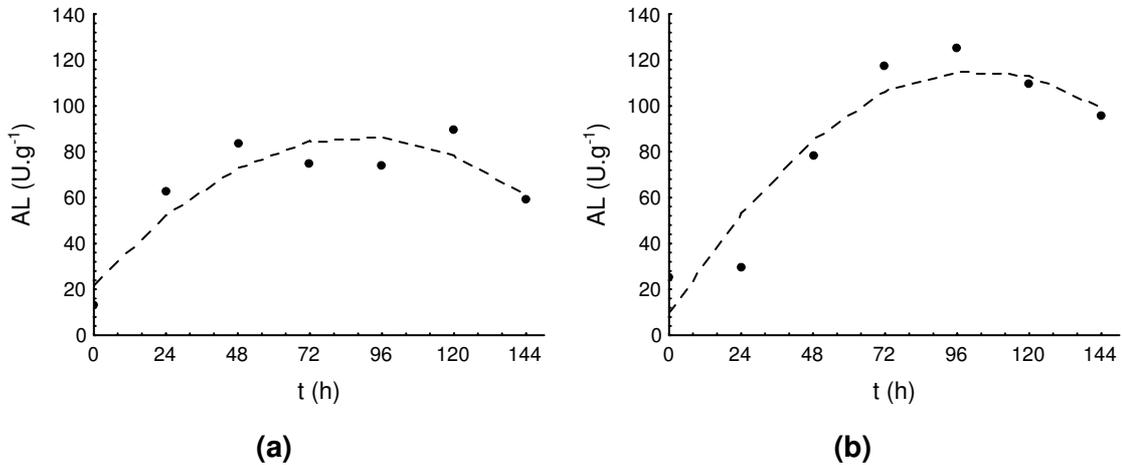


Figura 3. Resultados de Atividade Lipolítica (AL) no decorrer do tempo de fermentação (t) experimentais (●) e ajustados (□) utilizando polinômios de segunda para as condições de (a) 40 e (b) 110 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹, sem fonte adicional de carbono e com óleo diesel, respectivamente.

Para obtenção do modelo, o conjunto de valores de cada coeficiente (Ca, Cb e Cc), foi ajustado a uma reta (Equação 2, 3 e 4), sendo esta dependente de uma outra função, denominada função Z (Equação 5).

$$Ca = Ba + Bb.Z \quad \text{Equação 2}$$

$$Cb = Bc + Bd.Z \quad \text{Equação 3}$$

$$Cc = Be + Bf.Z \quad \text{Equação 4}$$

Onde

$$Ba, Bc \text{ e } Be: B_i$$

$$Bb, Bd \text{ e } Bf: B_j$$

$$Z = \text{sen} (a1.\log(a2.V)) \quad \text{Equação 5}$$

Para a obtenção da função Z, parametrizada em relação à aeração ($V_{L-ar} \cdot g_{meio}^{-1} \cdot h^{-1}$), os parâmetros a1 e a2 foram variadas entre os valores 0,01 e 5. Assim, o par (a1, a2) que apresentou o maior valor para o coeficiente de determinação foi escolhido.

Assim como o ajuste polinomial (Equação 1), o ajuste linear parametrizado em função da aeração através da equação trigonométrica (Equação 2), apresentou bons resultados. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Coeficientes (B_i e B_j) e parâmetros (a1 e a2) usados nas Equações 2 e 3 para os diferentes modelos matemáticos.

FAC	Coeficientes do polinômio	B_i	B_j	a1	a2	R^2
Sem FAC	Ca	47,379	-46,595	1,50	2,42	0,857
	Cb	0,732	1,268	1,52	2,28	0,888
	Cc	-0,003	-0,007	1,53	2,38	0,885
Óleo de soja	Ca	39,549	-40,944	1,5	2,63	0,746
	Cb	0,922	1,707	1,65	1,46	0,833
	Cc	-0,004	-0,010	1,65	1,43	0,782
Óleo diesel	Ca	4,703	-31,073	4,48	4,25	0,975
	Cb	0,187	1,701	1,59	2,01	0,905
	Cc	-0,004	0,006	1,26	1,35	0,881

R^2 : Coeficiente de determinação; FAC: Fonte adicional de carbono.

Observa-se que o valor de coeficiente de determinação (Tabela 2) mais baixo foi 0,857, mostrando que a função utilizada está adequada para descrever o processo em questão. No decorrer do tempo de fermentação foi encontrada uma Atividade Lipolítica máxima, a Equação 1 foi adequada para ser empregada como uma função objetivo. Este mesmo critério foi adotado por ELIBOL & OZER (2000), quando estudaram a influência da transferência de oxigênio na produção de lipase por *Rhizopus arrhizus*.

Os melhores resultados encontrados foram para o modelo com óleo diesel, apresentando como Atividade Lipolítica máxima $124,12 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$. Já os modelos utilizando óleo de soja e sem fonte adicional de carbono apresentaram $117,02$ e $100,31 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,

respectivamente. SILVA *et al.*, (2005) e DOMÍNGUEZ *et al.*, (2003) também mostraram que a fonte de carbono pode atuar como indutor da produção de lipase. SHARMA *et al.*, (2001) afirmaram que o mecanismo de biossíntese de lipase está ligado amplamente ao tipo de microrganismo em que se fornecem as fontes de carbono, sendo que sua produção pode ser influenciada não só pelo tipo da fonte, mas também pela concentração da mesma.

Para otimização do processo de produção de lipase foi usado Planejamento Composto Central com os níveis de variação mostrados na Tabela 3. Os pontos centrais 100,31 U.g⁻¹ e 103h, 117,02 U.g⁻¹ e 90h, 124,12 U.g⁻¹ e 119h, utilizados no PCC, para os experimentos sem fonte adicional de carbono, óleo de soja e óleo diesel, respectivamente, foram os melhores resultados fornecidos pelos modelos, tornando possível a sua otimização, como mostra a Figura 5.

Tabela 3. Níveis dos Planejamentos Compostos Centrais (PCC) utilizados na otimização da produção de lipase para cada condição de fonte adicional de carbono (óleo de soja, óleo diesel e sem fonte).

Experimentos	Variável	- α	- 1	0	+ 1	+ α
Sem FAC	X ₁	81,72	90	110	130	138,28
	X ₂	69,06	79	103	127	136,94
Óleo de soja	X ₁	51,72	60	80	100	108,28
	X ₂	56,06	66	90	114	123,94
Óleo diesel	X ₁	31,72	40	60	80	88,28
	X ₂	85,06	95	119	143	152,94

X₁: Aeração (mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹); X₂: Tempo de fermentação (h); FAC: Fonte adicional de carbono.

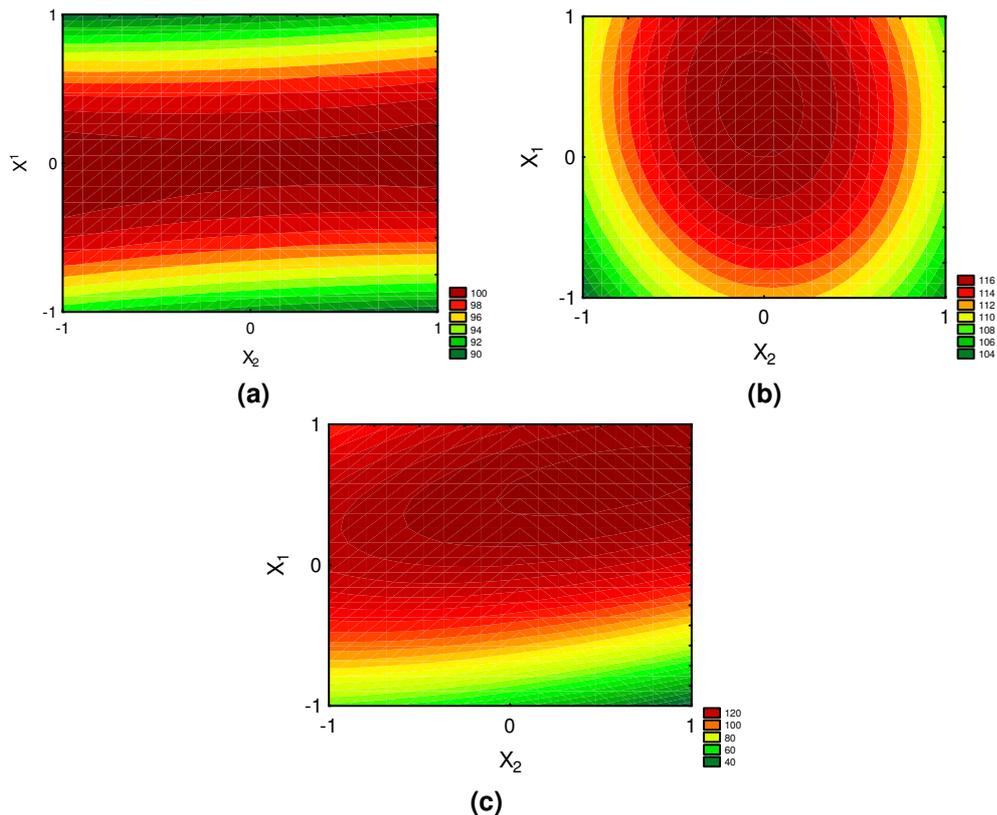


Figura 5. Curvas de Contorno da otimização da produção de lipase por *Aspergillus fumigatus* em função do (X_1) tempo de fermentação e (X_2) aeração, **(a)** sem utilizar fonte adicional de carbono, **(b)** utilizando óleo de soja e **(c)** óleo diesel.

Na ausência de fonte adicional de carbono foi observada a menor variação nos resultados de Atividade Lipolítica, mostrando que a aeração teve pequena influência na produção da enzima. Este comportamento não foi observado nos experimentos com óleo de soja e óleo diesel (Figuras 5b e 5c, respectivamente).

Para verificar a confiabilidade dos resultados provenientes dos experimentos sem a adição de fonte adicional de carbono foi realizado um Planejamento Fatorial 2^2 com duplicata no ponto central, utilizando os mesmos níveis de variação do PCC da otimização.

Através dos resultados obtidos pelo Planejamento Fatorial, realizado para os experimentos sem fonte adicional de carbono, foi observada diferença de 0,46% a mais que o encontrado pelo modelo. Isto mostra que apesar da pequena variação nas respostas de Atividades Lipolítica modeladas, o valores da otimização da produção de lipase são praticamente iguais, mostrando que o modelo responde ao processo estudado.

Sabe-se que na otimização de processos de produção, o tempo é um dos fatores mais importantes, uma vez que afeta diretamente a produtividade. Apesar dos melhores resultados de Atividade Lipolítica terem sido encontrados quando foi utilizado

óleo diesel, a condição em que se utilizou óleo de soja pode ser mais vantajosa, pois apresentou 94,27% da Atividade Lipolítica máxima encontrada nos experimentos com óleo diesel, em um tempo 29h menor.

O uso de modelos matemáticos como os desenvolvidos neste trabalho ainda são pouco utilizados nas pesquisas de fermentação em estado sólido e o reaproveitamento de subprodutos da indústria arrozeira pode ser usado para minimizar a quantidade de resíduos liberados, bem como minimizar os custos experimentais de produção de lipase por fermentação em estado sólido utilizando *Aspergillus fumigatus*.

4. Conclusões

Os resultados dos modelos desenvolvidos seguem as tendências dos resultados experimentais, apresentando faixas de Atividades Lipolítica bastantes semelhantes. Os resultados da otimização da produção de lipase foram, 100,31 U.g⁻¹ em 103h, 117,02 U.g⁻¹ em 90h e 124,12 U.g⁻¹ em 119h, respectivamente, para os experimentos sem fonte adicional de carbono, óleo de soja e óleo diesel. A utilização de óleo de soja torna uma alternativa promissora na produção de lipase, visto que alcançou 94,27% da Atividade Lipolítica máxima encontrada em 29h antes que os experimentos com óleo diesel.

5. Referências Bibliográficas

AOAC. **Official Methods of Analysis of International**. 16th Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.

BHUSHAN, B.; DOSANJH, N. S.; HOONDAL, G. S. Lipase production from an alkalophilic yeast sp. by solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**. v.16, p. 841–842, 1994.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; SCHMIDELL, W. **Biociencia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Volume 2, São Paulo/SP, Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

BURKERT, J.F.M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**. v. 91, p. 77-84, 2004.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA, J. G. L.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**. v.4, p. 239–247, 2000.

CHRISTAKOPOULOS, P.; TZIA, C.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of extracellular lipase from *Calvatia gigantea*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 38, p. 194-197, 1992.

DOMÍNGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M.A.; SANROMÁN, A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**. v. 25, p. 1225-1229, 2003.

ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**. v. 36, p. 325-329, 2000.

GANDHI, N. N. Application of lipases. **Journal of the American Oil Chemists Society**. . 74, n. 6, p. 621-634, 1997.

GOMBERT, A. K.; PINTO, A.L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Proc. Biochem**. v. 35, p. 85–90, 1999.

HASAN, S. D. M.; COSTA, J. A. V.; SANZO, A. V. L. Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnology Techniques**. v. 12, n. 10, p. 787–791, 1998.

HATZINIKOLAOU, D. G.; MACRIS, J. B.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; KOLISIS, F. N.; FOUNTOUKIDIS. Production and parcial characterization of lipase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**. v. 18, p. 547-552, 1996.

HESELTIME, C. W., Biotechnology report: solid state fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**. v.14, p. 517-532, 1972.

HONGZHANG, C.; FUJIAN, X.; ZHONGHOU, T.; ZUOHU, L. A Novel Industrial-Level Reactor with Two Dynamic Changes of Air for Solid-State Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 93, n. 2, p. 211-214, 2002.

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

KANWAR, L.; GOGOI, B. K.; GOSWAMI, P. Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. **Bioresource Technology.** v. 84, p. 207–211, 2002.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. Editors. **Industrial Biotransformations.** Weinheim: Wiley – VCH, 2000.

LONG, K.; GHAZALI, H. M.; ARIFF, A.; AMPON, K.; BUCKE, C. Mycelium bound lipase from a locally strain of *Aspergillus flavus* link: pattern and factors involved in its production. **Journal Chemistry Technology Biotechnology.** v. 67, p. 157-163, 1996.

MACÊDO, G.A.; PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Journal of the Brazilian Society for Microbiology** v. 28, p. 90-95, 1997.

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

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

PUTHLI, M. S.; RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor. **Biochemical Engineering Journal.** v. 27, p. 287-294, 2006.

RIVERAMUNOZ, G.; TINOCOVALENCIA, J.; SANCHEZ, S.; FARRÉS, A. Microbial lipases in a solid-state fermentation system. **Biotechnology Letters.** v. 13, p. 277–280, 1991.

RODRIGUES, L.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R.; MEI, H. C. V. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. **Process Biochemistry.** v. 41, p. 1-10, 2006.

SEN, R. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. **J Chem Technol Biotechnol.** v. 68, p. 263-270, 1997.

SHARMA, R.; CHRISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances.** 19, 627-662, 2001.

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

YOU LI, C.; CHENG, C. Y.; CHEN, T. L. Fed – batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. **Biochemical Engineering Journal.** 19, 25-31, 2004.

ARTIGO III:

PRODUÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO

PRODUÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO

Short title: Otimização da Produção de Biossurfactante

Laboratório de Engenharia bioquímica, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Caixa postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil, Telefone: +55(53)3233-8653, e-mail: dqmjorge@furg.br

Resumo: O interesse pelos biossurfactantes de origem microbiológica vem aumentando durante a última década pelas vantagens a eles atribuídas, tais como potencial de aplicações em áreas de processamento de alimentos, capacidade de emulsificação, biodegradabilidade, baixa toxicidade, entre outros. O presente trabalho teve por objetivo otimizar a produção de biossurfactante por fermentação em estado sólido em biorreatores de coluna e leito fixo com o fungo *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. A otimização dos experimentos conduzidos durante 144h, com aeração variando de 0 a 200 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹, mantidos a 30°C em diferentes fontes adicionais de carbono apresentaram Atividades Emulsificante 11,17 UE.g⁻¹ fornecendo 148 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ na ausência de fonte adicional de carbono, 8,47 UE.g⁻¹ com 119 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ adicionado de óleo de soja e 9,99 EU.g⁻¹ utilizando 140 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ com diesel. Estes resultados mostram que a diferença encontrada para as diferentes condições nutricionais e fornecimento de ar influenciaram significamente (p<0,05) na produção do biossurfactante.

Palavras chave: *Aspergillus fumigatus*, biossurfactante, fermentação em estado sólido, otimização.

Abstract: The interest for the microbiological biosurfactants have been increasing during the last decade because of the advantages assigned to them, such as the potential of applications in food processing areas, emulsification capacity, biodegradability, low toxicity, among others. This work had as purpose to optimize the biosurfactants production by solid-state fermentation in bioreactors of column and fixed berth with the *Aspergillus fumigatus*, using agro-industrial waste with substract. The optimization of the conducted experiments during 114h, with aeration varying from 0 to 200 mL_{air}.g_{substrate}⁻¹.h⁻¹, maintained in 30°C in different carbon extra sources, presented Emulsificant Activities 11,17 UE.g⁻¹ providing 148 mL_{air}.g_{substrate}⁻¹.h⁻¹ in the absence of a carbon extra source, 8,47 UE.g⁻¹ with 119 mL_{air}.g_{substrate}⁻¹.h⁻¹ added to soybean oil and 9,99 EU.g⁻¹ using mL_{air}.g_{substrate}⁻¹.h⁻¹ with diesel oil. Those results show that the difference found for the different nutritional conditions and air supply influenced significantly (p<0,05) in the biosurfactant production.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, biosurfactant, solid-state fermentation, optimization.

1. Introdução

Mudanças significativas nos últimos anos foram feitas nos processos fermentativos em estado sólido (SSF) e estudos comparativos com os processos submersos mostram que os rendimentos e o potencial de recuperação de produtos são mais vantajosos nos processos de fermentação em estado sólido (PANDEY *et al.*, 1999). Devido à capacidade de crescimento em baixos níveis de água nos sistemas de SSF, os fungos filamentosos têm recebido a maior parte das atenções nas pesquisas (HESSELTINE, 1972). Culturas de *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* são utilizados para obtenção de vários bioprodutos em SSF (BORZANI *et al.*, 2001).

A maioria dos surfactantes produzidos são quimicamente derivados do petróleo e, segundo BOGNOLO (1999), 70 a 75% destes são consumidos por países industrializados. Entretanto, o interesse por biosurfactantes tem aumentado devido a sua diversidade estrutural, permitindo ser aplicado em diversas áreas (LANG, 2002). A síntese microbiana de biosurfactante se dá especialmente durante o crescimento em substratos imiscíveis em água, tornando uma alternativa de substituição dos surfactantes químicos. Devido à baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, estas moléculas podem ser usadas amplamente no processamento de alimentos (emulsificantes e umectantes), na indústria de cosméticos, fármacos, detergentes, entre outros. Além disso, são ecologicamente seguros e podem ser aplicados nos processos de biorremediação e tratamento de efluentes (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002).

Os biosurfactantes são biomoléculas contendo uma parte lipofílica e outra hidrofílica. A parte lipofílica pode ser composta de uma cadeia de ácido graxo, proteína ou um peptídeo, com uma alta proporção de cadeias hidrofóbicas. Já a parte hidrofílica pode ser um grupo carboxil de ácidos graxos ou aminoácidos, grupo fosforil de fosfolipídios, grupo hidroxil de sacarídeos, e peptídeos (MORIKAWA *et al.*, 2000). O potencial de aplicação de compostos de superfície ativa, como é caso dos biosurfactantes, é baseado nas propriedades de emulsificação, umedecimento, solubilização, de-mulsificação, separação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial (MULLIGAN *et al.*, 2001; FIECHTER, 1992).

Os biosurfactantes são capazes de atuar na interface das células apresentando diferentes polaridades, em especial óleo/água, ar/água e agindo como agentes umectantes em superfícies sólidas (água/sólido). Esse processo dinâmico é baseado na habilidade dos biosurfactantes reduzir a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas-hidrofílicas. Isto faz

com que a área superficial aumente, proporcionando uma maior biodisponibilidade e conseqüente biodegradabilidade (SHAFI & KHANNA, 1995).

A modificação das condições fisiológicas e composição do meio de cultivo são algumas alternativas que vêm sendo estudadas para o aumento da produtividade dos biossurfactantes. Recentes avanços na área de otimização destas condições estão resultando no aumento significativo na sua produção, o que é comercialmente atrativo (RODRIGUES *et al.*, 2006).

A produção de biossurfactante dispensa o uso de substratos de alto custo, podendo ser utilizados resíduos agroindustriais, viabilizando economicamente o processo, uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 50% do custo final do produto (MAKKAR & CAMEOTRA, 1999).

O objetivo do presente trabalho foi otimizar a produção de biossurfactante por fermentação em estado sólido com *Aspergillus fumigatus*, variando a vazão de ar e a fonte adicional de carbono.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismo

Para a realização dos experimentos foi utilizada a cepa do fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus*, cedido pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP). O microrganismo foi mantido em tubos de ensaio, com agar batata-dextrose (PDA) adicionados de 1% de glicerina a 4°C.

2.2. Descrição do sistema

Os cultivos foram conduzidos no sistema descrito por HASAN *et al.*, 1998. As fermentações realizadas em biorreatores de coluna encamisada, com dimensões internas de 50 mm de diâmetro e 250 mm de altura, foram mantidas a 30°C durante 144h. O ar fornecido por bombas de diafragma foi filtrado, umidificado e transferido para o eliminador de gotas, com o objetivo de manter a umidade do ar constante. A injeção de ar de cada experimento foi controlada através de rotômetros instalados na base de cada biorreator. O esquema do experimento está representado na Figura 1.

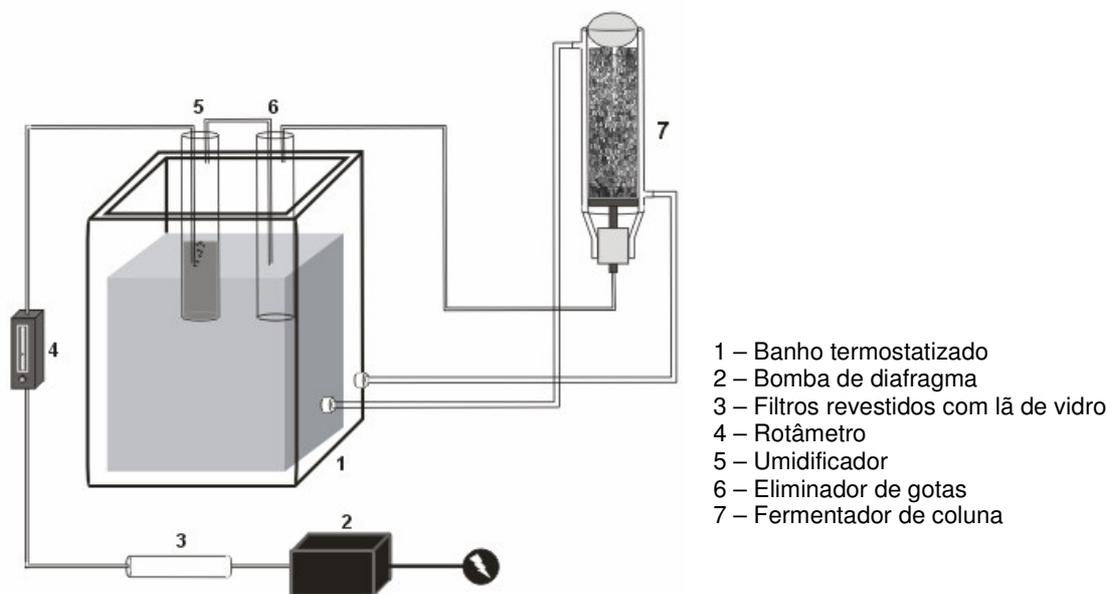


Figura 1. Esquema de fermentação em estado sólido com biorreatores de coluna.

O meio de cultivo foi composto por casca e farelo de arroz. O farelo foi moído em moinho de facas, utilizando malha de 1 mm. Após a moagem, o farelo foi peneirado e as partículas retidas entre as peneiras 35 e 32 da série Tyler (0,42 e 0,50 mm, respectivamente) foram coletadas. Além da casca e do farelo de arroz, também fez parte do meio fermentativo 90mL de solução nutriente composta por (g.L⁻¹): MgSO₄.7H₂O (0,5), NaNO₃ (3,0), KH₂PO₄ (1,0), extrato de levedura (1,0) e peptona (0,3).

Óleo de soja e diesel foram adicionados em experimentos separados, na proporção de 1% (w/w), como fonte adicional de carbono, para posterior comparação com experimentos sem a sua adição. Além de cultivos sem alimentação de ar, foram avaliadas as aerações 40, 60, 100, 120 e 200 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹. A concentração inicial de esporos adicionados aos meios de cultivo foi 4.10⁶ esporos.g_{meio}⁻¹.

2.3. Análises envolvidas

2.3.1. Extração do biossurfactante

A extração do biossurfactante do meio fermentado foi realizada com água destilada na proporção 1:5 (uma parte de soluto para cinco partes de solvente). Após a adição do solvente, a amostra foi submetida à agitação em shaker Certomat, BS-1 a 160 rpm e 50°C por 30 min. A seguir, a amostra foi filtrada a vácuo em funil de Büchner, obtendo o extrato para a avaliação da atividade emulsificante.

2.3.2. Medida de Atividade Emulsificante

Para determinação da Atividade Emulsificante utilizou a metodologia descrita por JOHNSON *et al.*, 1992. O filtrado proveniente da extração do biossurfactante juntamente com água destilada e óleo de soja, foram agitados durante 1 min, deixando em repouso por 60 min e posteriormente submetidos à leitura em espectrofotômetro a 610nm. A Atividade Emulsificante foi expressa em Unidades Emulsificantes (EU.g⁻¹), definida como a massa de biossurfactante necessária para aumentar a absorbância em 1,0 unidade à 610nm, quando comparado com o branco.

A unidade das amostras foi determinada segundo a metodologia da AOAC (1995), para posterior conversão dos resultados para base seca.

2.4. Tratamento dos resultados

Os resultados foram avaliados primeiramente através de análise estatística qualitativa utilizando o software R, versão 2.0.0 (Core Team), seguida das análises de variância uni e multivariada. Nesta última, foi realizada Análise de Cluster utilizando o método de Manhattan, considerando a distância entre os resultados de Atividade Emulsificante mais próximos como a distância entre os agrupamentos.

2.5. Otimização

Em cada condição de aeração foram coletados resultados ótimos de Atividade Emulsificante, obtidos através dos experimentos, onde posteriormente foram maximizados em função da aeração.

As curvas de Atividades Emulsificante ótimas referentes à cada aeração utilizada foram ajustadas polinomialmente, sendo possível estabelecer a tendência do comportamento do processo de produção do biossurfactante e determinar a condição ótima de operação.

3. Resultados e Discussão

Na Figura 2 são mostrados os perfis de Atividade Emulsificante encontrados para as diferentes condições de aeração e fonte adicional de carbono estudadas.

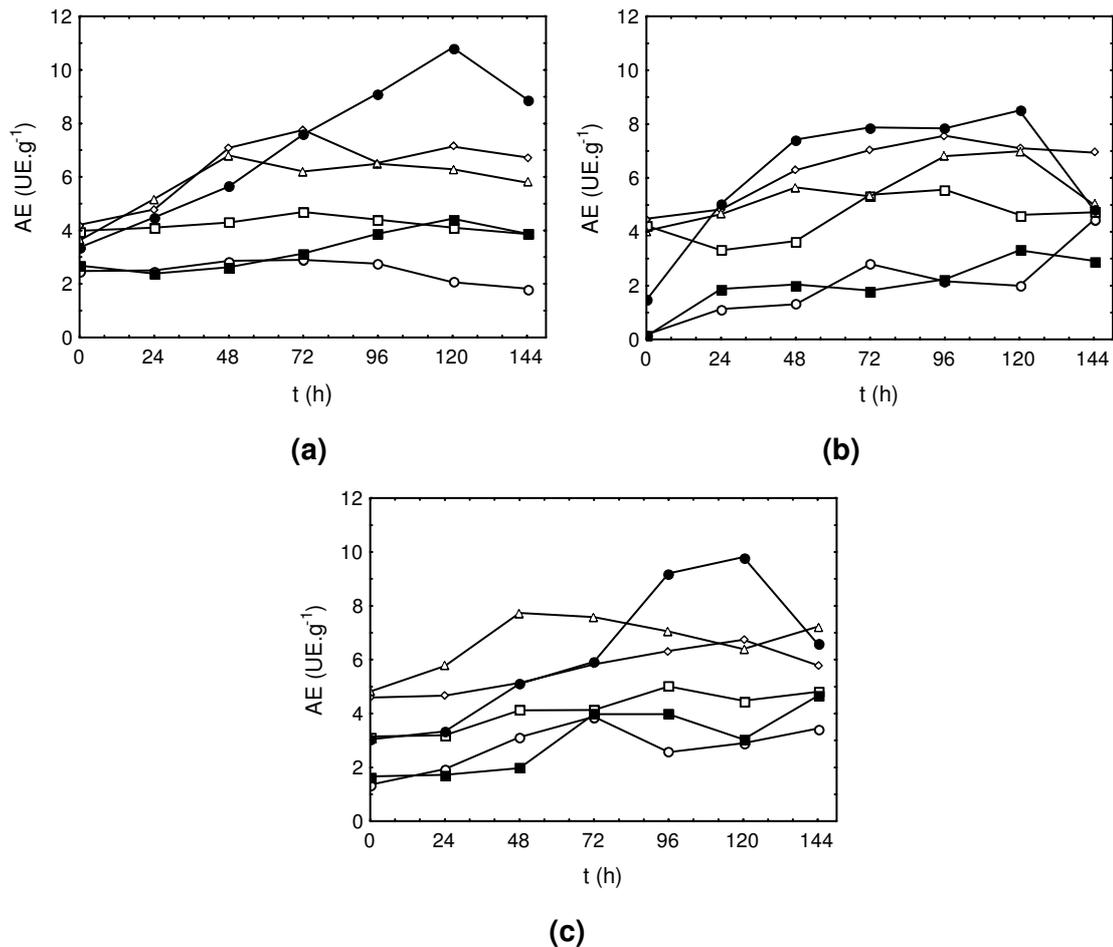


Figura 2. Perfil de Atividade Emulsificante (AE) em função do tempo de fermentação (t) para os experimentos utilizando (○) 0, (□) 40, (◇) 60, (△) 100, (●) 120 e (■) 200 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹. **(a)** sem fonte adicional de carbono, **(b)** óleo de soja e **(c)** óleo diesel.

No decorrer da fermentação é possível observar que os valores de Atividade Emulsificante se mostraram diferentes para as condições de aeração estudadas, independente da fonte adicional de carbono utilizada, mostrando que a produção de biossurfactante foi influenciada pela taxa de ar fornecida ao meio de fermentação nas diferentes condições nutricionais.

VEENANADIG *et al.*, (2000) estudaram o efeito do fornecimento de ar ao meio de fermentação em estado sólido utilizando biorreatores de coluna, com *Bacillus subtilis* FE-2 em leito fixo, onde encontrou melhores resultados nos experimentos com maiores taxas de ar. A transferência de oxigênio pode ser aumentada através do maior fluxo de ar, resultando em uma fermentação mais eficiente, ocasionando o aumento da quantidade de biossurfactante produzido. Os pesquisadores comentam que estudos realizados com taxas de ar muito elevadas podem ocasionar a diminuição da umidade do meio de fermentação em biorreatores de coluna. Este comportamento

também foi verificado no presente trabalho, sendo que $200 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ resultou na redução da umidade em até 16,02%, influenciando na redução da quantidade de biossurfactante produzida nesta condição.

A maioria dos experimentos apresentaram as melhores Atividade Emulsificantes em 120h de fermentação. Aqueles que foram submetidos à ausência de aeração, bem como os experimentos com vazão de ar superior ($200 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) se observa uma menor Atividade Emulsificante, influenciada, respectivamente, pela falta de oxigenação e redução da umidade do meio.

De acordo com os resultados encontrados, os experimentos utilizando somente casca e farelo de arroz foram os que apresentaram os melhores resultados ($9,13$ e $10,83 \text{ UE} \cdot \text{g}^{-1}$), cuja condição de aeração utilizada foi $120 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Vários são os estudos envolvendo a utilização de diferentes substratos na produção de biossurfactantes, mostrando que podem atuar como indutores, influenciando no tipo e rendimento do biossurfactante (MAKKAR e CAMEOTRA, 1998, 1997; KOSARIC *et al.*, 1987; COOPER, 1986). LEVIŠAUSKAS *et al.*, (2004) assumem que a concentração de carbono, nitrogênio e fontes de nutrientes específicos para taxa de crescimento celular são os mais importantes fatores que influenciam a biossíntese de biossurfactante.

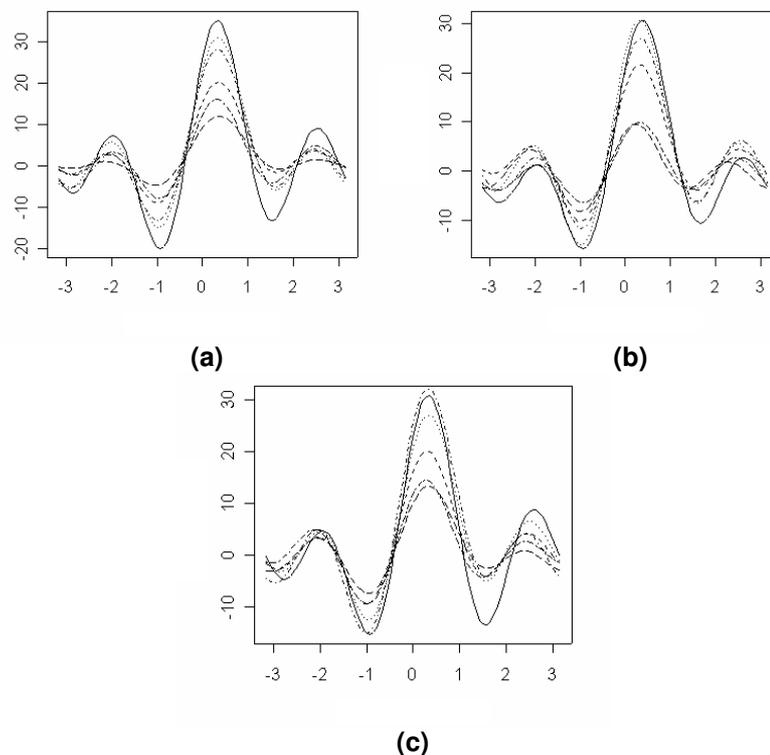


Figura 3. Gráfico de Andrews para os experimentos para as diferentes vazões de ar: **(a)** sem fonte adicional de carbono, **(b)** com óleo de soja e **(c)** óleo diesel.

O gráfico de Andrews, apresentado na Figura 3, mostra que os experimentos com diferentes aerações apresentam diferenças significativas qualitativa, uma vez que as linhas (representam cada condição experimental) não estão próximas de se sobreporem.

A diferença significativa ($p < 0,01$) entre os experimentos pode ser verificada através da análise de variância univariada dos resultados. Esta observação foi constatada para todos os experimentos com as distintas fontes adicionais de carbono utilizadas. Porém, alguns experimentos apresentaram comportamentos semelhantes. Isto sugere a existência de grupos distintos que apresentam comportamentos similares. Para verificar esta afirmação foi aplicada a Análise de Cluster, mostrada na Figura 4.

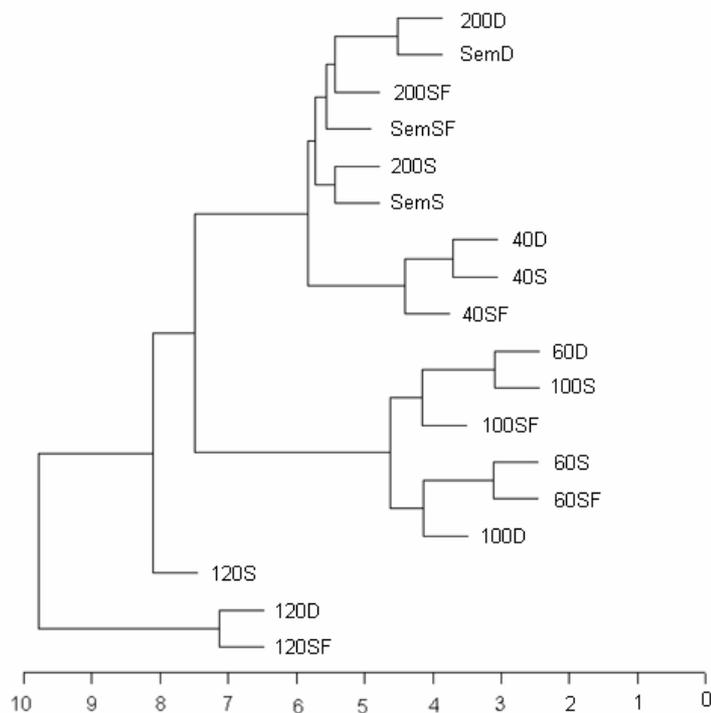


Figura 4. Diagrama de Cluster para os resultados de Atividade Emulsificante, onde as letras referem-se aos experimentos sem fonte adicional de carbono (SF), óleo de soja (S) e óleo diesel (D) e os números à vazão de ar ($\text{mL}_{\text{ar}}.\text{g}_{\text{meio}}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Através do digrama de Cluster, mostrado na Figura 4, se verifica a existência de 4 grupos de experimentos com diferentes similaridades em relação à taxa de ar fornecida ao meio de fermentação: Grupo 1, experimentos sem aeração e com $200 \text{ mL}_{\text{ar}}.\text{g}_{\text{meio}}^{-1}.\text{h}^{-1}$; Grupo 2, 60 e $100 \text{ mL}_{\text{ar}}.\text{g}_{\text{meio}}^{-1}.\text{h}^{-1}$; Grupo 3, $40 \text{ mL}_{\text{ar}}.\text{g}_{\text{meio}}^{-1}.\text{h}^{-1}$; e Grupo 4, $120 \text{ mL}_{\text{ar}}.\text{g}_{\text{meio}}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A similaridade verificada em cada Grupo foi observada tanto para as diferentes fontes adicionais de carbono quanto para as aerações utilizadas. No

Grupo 1, o comportamento observado se deve aos extremos de aeração utilizados, compreendendo o grupo que apresenta os valores de Atividade Emulsificante mais baixos, seguido em ordem crescente dos Grupos 3, 2 e 4, respectivamente.

O Grupo 4 apresentou distintos comportamentos, mostrando que, além de apresentar as maiores Atividades Emulsificante, a influência da fonte adicional de carbono pode ser observada nos melhores resultados encontrados.

A otimização dos resultados de Atividade Emulsificante, feita separadamente para cada fonte adicional de carbono, é mostrada na Figura 5.

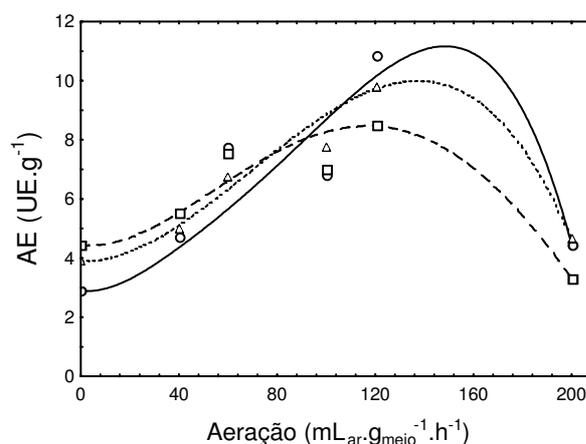


Figura 5. Máximas Atividades Emulsificantes (AE) encontradas para as diferentes vazões de ar estudadas para os meios (o) sem fonte adicional de carbono, (□) óleo de soja e (Δ) óleo diesel, para seus respectivos resultados ajustados (—), (----) e (.....).

As curvas de Atividades Emulsificante máximas, ajustadas em função das vazões de ar fornecidas aos experimentos, teve por objetivo estabelecer uma tendência em relação aos resultados experimentais. Através do ajuste matemático foram gerados 350 pontos referentes a cada curva, sendo possível verificar a melhor Atividade Emulsificante de 11,17 UE.g⁻¹ fornecendo 148 mL.ar.gmeio⁻¹.h⁻¹ na ausência de fonte adicional de carbono. Para os experimentos com óleo diesel foi observado 9,99 UE.g⁻¹ utilizando 140 mL.ar.gmeio⁻¹.h⁻¹ e com óleo de soja 8,47 UE.g⁻¹ com 119 mL.ar.gmeio⁻¹.h⁻¹. Esta diferença nos resultados da otimização mostra a influência da fonte adicional de carbono sobre a produção de biossurfactante, tornando vantajosa sua ausência em relação às demais fontes utilizadas neste processo.

Tendo em vista a busca por tecnologias simples, bem como a minimização dos custos de produção, os resultados encontrados na otimização da produção de biossurfactante com *Aspergillus fumigatus* por fermentação em estado sólido utilizando substratos de baixo custo apresentaram-se promissores.

4. Conclusões

Os experimentos mostraram diferenças significativas nos resultados de Atividade Emulsificante tanto para as diferentes vazões de ar fornecidas como para os diferentes meios utilizados. Os maiores valores de Atividade Emulsificante foram encontradas em 120h após o seu início do processo. Foi verificada a existência de 4 grupos de experimentos com comportamentos diferentes de produção de biosurfactante. Grupo 1, experimentos sem aeração e com $200 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; Grupo 2, 60 e $100 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; Grupo 3, $40 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; e Grupo 4, $120 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. A Atividade Emulsificante encontrada na otimização foi $11,17 \text{ UE} \cdot \text{g}^{-1}$ para o meio sem fonte adicional de carbono e aeração $148 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Agradecimento: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

5. Referências Bibliográficas

AOAC. Official Methods of Analysis of International. 16th Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces*. v. 152, p. 41-52, 1999.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. Volume 2, São Paulo/SP, Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

COOPER, DG. Biosurfactants. *Microbiological Sciences*. v. 3, n. 5, p. 145-149, 1986.

FIECHTER A. Biosurfactantes: moving towards industrial application. *Trends in Food Science and Technology*. v. 31, p. 283-293, 1992.

HASAN, S. D. M.; COSTA, J. A. V.; SANZO, A. V. L. Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. *Biotechnology Techniques*. v. 12, n. 10, p. 787–791, 1998.

HESELTIME, C. W., *Biotechnology report: solid state fermentations*. *Biotechnology and Bioengineering*. v.14, p. 517-532, 1972.

JOHNSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; SISTA, V.; YADAV, N. K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *Biotechnology Letters*. 14, 6, 487-490, 1992.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C., *Biosurfactants and Biotechnology*. Surfactants science series. New York: Marcel Dekker, v. 25, 1987.

LANG, S. Biological Amphiphiles (microbial biosurfactants), *Current Opinion I Colloid & Interface Science*. v. 7, p. 12-20, 2002.

LEVIŠAUSKAS, D.; GALVANAUSKAS, V.; ŽUNDA, G.; GRIGIŠKIS, S. Model-based optimization of biosurfactant production in fed-batch culture *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnology Letters*. v. 26, p. 1141-1146, 2004.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 58, p. 428-434, 2002.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. *Journal of Surfactants and Detergents*. v. 2, n. 2, p. 237-241, 1999.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Surfactants and Detergents*. v. 20, p. 48-52, 1998.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. v. 18, p. 37-42, 1997.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1488. 211-218. 2000.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*. v. 60, p. 371-380, 2001.

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

RODRIGUES, L.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R.; MEI, H. C. V. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. *Process Biochemistry*. v. 41, p. 1-10, 2006.

SHAFI, R.; KHANNA, S. Biosurfactants. *Indian Journal of Microbiology*, n. 33, p. 163-184, 1995.

VEENANADIG, N. K.; GOWTHAMAN, M. K.; KARANTH, N. G. K. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. *Bioprocess Engineering*. v. 22, p. 95-99, 2000.

ARTIGO IV:

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS DA
INDÚSTRIA ARROZEIRA COMO SUBSTRATO**

PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA ARROZEIRA COMO SUBSTRATO

Short title: Produção de Lipase por fermentação em estado sólido

Laboratório de Engenharia bioquímica, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Caixa postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil, Telefone: +55(53)3233-8653, e-mail: dqmjorge@furg.br

Resumo: Os avanços biotecnológicos na produção industrial de lipase vêm proporcionando a aplicação desta enzima nos diferentes setores, tornando-a economicamente viável. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de lipase por fermentação em estado sólido utilizando *Aspergillus fumigatus* utilizando diferentes fontes adicionais de carbono e condições de aeração. Os experimentos foram realizados em biorreatores de coluna com aerações 0, 60 e 120 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹, utilizando óleo de soja e óleo diesel como fonte adicional de carbono. Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) nos resultados de Atividade Lipolítica para o tempo de fermentação e para as diferentes vazões de ar fornecidas ao meio de fermentação nos experimentos sem fonte adicional de carbono e óleo diesel, respectivamente. As Atividades Lipolítica foram 105,34, 119,46 e 127,22 U.g⁻¹ para os experimentos sem fonte adicional de carbono, óleo de soja e óleo diesel, respectivamente.

Palavras chave: *Aspergillus fumigatus*, fermentação em estado sólido, lipase.

Abstract: The progresses biotechnological in the industrial production of lipase are providing the application of this enzyme in the different sections, turning her economically viable. This work had as purpose to evaluate the production of lipase by *Aspergillus fumigatus* using different carbon extra sources and aeration conditions by solid-state fermentation. The experiments were made in bioreactors of column with aerations 0, 60 and 120 mL_{air}.g_{substrate}⁻¹.h⁻¹, using soybean oil and diesel oil as carbon extra source. Significant differences were seen ($p < 0,05$) in the results Lipase Activity for the different times fermentation and air sewages provided to the fermentation environment. The Lipase Activity was 105,34, 119,46 e 127,22 U.g⁻¹ for the experiments in the absence of a carbon extra source, using soybean oil and diesel oil, respectively.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, solid-state fermentation, lipase.

1. Introdução

As lipases (triacilglicerol hidrolases EC 3.1.1.3) são responsáveis pela catalise de reações que envolvem hidrólise e síntese de éster a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeias longas. Seu potencial biotecnológico é devido à alta estabilidade em solventes orgânicos, não requerer a presença de cofatores, possuem uma ampla especificidade pelo substrato e apresentam alta enantiosseletividade (CASTRO & ANDERSON, 1995).

As lipases apresentam uma grande importância industrial em relação as demais enzimas (HATZINIKOLAOU *et al*, 1996; CHRISTAKOPOULOS *et al*, 1992). Além da grande importância industrial, as lipases podem ser usadas na biodegradação de efluentes das indústrias de laticínios, carnes, óleos vegetais, entre outras (HIOL *et al*, 2000). Além disso, são utilizadas também na produção de fármacos e no desenvolvimento de tecnologias baseadas na síntese de novos compostos (LIESE *et al.*, 2000).

Entre os processos químicos de maior interesse pelas indústrias estão as reações catalisadas por lipases, as quais representam aproximadamente 20% das biotransformações realizadas atualmente (FABER, 1997, citado por OLIVEIRA *et al.*, 2000).

As lipases são produzidas por um grande número de microrganismos, incluindo bactérias, bolores e leveduras. A preferência pela utilização industrial de fungos é atribuída à produção de lipase normalmente extracelular, o que facilita a extração do meio fermentado. Na produção de lipases a partir de fungos, os substratos lipídicos atuam como indutores (LONG *et al.* 1996; POKORNY *et al*, 1994).

A fermentação em estado sólido tem sido empregada em processos de bioconversão e possui um grande potencial para produção de enzimas (PANDEY, 2000). CASTILHO *et al.*, (2000) mencionam resultados com respeito a investimentos feitos para a produção de lipases, mostrando que a grande vantagem da SSF é devido seu baixo custo envolvido, quando comparada ao processo de fermentação submerso. Estudos mostram que os processos de fermentação em estado sólido apresentam rendimentos e potencial de recuperação de produtos mais vantajosos que os processos submersos (PANDEY *et al.*, 1999).

A busca de diferentes fontes de carbono para a produção de lipase, torna-se importante estudo para a minimização do seu custo de produção (CIAFARDINI, 2006; BURKERT *et al.*, 2004; YOU LI *et al*, 2004; MURALIDHAR *et al*, 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de lipase por *Aspergillus fumigatus* em processo de fermentação em estado sólido utilizando diferentes condições de aeração e fontes adicionais de carbono.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismo

Foi utilizado o fungo filamentososo *Aspergillus fumigatus*, cedido pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP). O microrganismo foi mantido à 4°C em tubos de ensaio, com agar batata-dextrose (PDA) adicionados de 1% de glicerina.

2.2. Descrição do sistema

Os cultivos foram conduzidos no sistema descrito por HASAN *et al.*, 1998. As fermentações realizadas em biorreatores de coluna encamisada, com dimensões internas de 50 mm de diâmetro e 250 mm de altura, foram mantidas a 30°C durante 144h. O ar fornecido por bombas de diafragma foi filtrado, umidificado e transferido para o eliminador de gotas, com o objetivo de manter a umidade do ar constante. A injeção de ar de cada experimento foi controlada através de rotômetros instalados na base de cada biorreator. O esquema do experimento está representado na Figura 1.

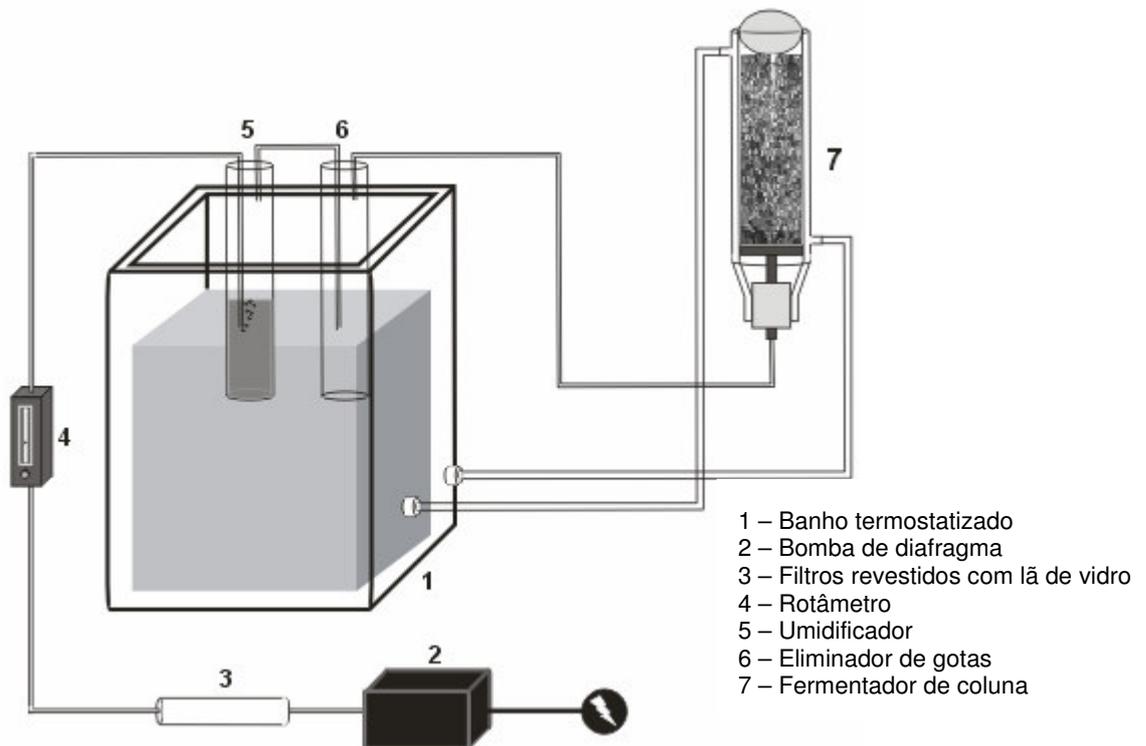


Figura 1. Esquema de fermentação em estado sólido com biorreatores de coluna.

O meio de cultivo foi composto por casca e farelo de arroz. O farelo foi moído em moinho de facas, utilizando malha de 1 mm. Após a moagem, o farelo foi peneirado e as partículas retidas entre as peneiras 35 e 32 da série Tyler (0,42 e 0,50 mm, respectivamente) foram coletadas. Além da casca e do farelo de arroz, também

fez parte do meio fermentativo 90mL de solução nutrientes composta por (g.L⁻¹): MgSO₄.7H₂O (0,5), NaNO₃ (3,0), KH₂PO₄ (1,0), extrato de levedura (1,0) e peptona (0,3).

Óleo de soja ou óleo diesel foram adicionados em experimentos separados, na proporção de 1% (p/p), como fonte adicional de carbono, para posterior comparação com experimentos sem a sua adição. Além de cultivos sem alimentação de ar, foram avaliadas aerações de 60 e 120 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹.

2.3. Análises envolvidas

2.3.1. Extração da enzima

Para extração da enzima utilizou-se tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) na proporção 1:10 (p/v). Após a adição do tampão, a amostra foi agitada em Shaker a 160 rpm e 30°C por 30 min e filtrada a vácuo em funil de Büchner, obtendo o extrato para a avaliação da Atividade Lipolítica.

2.3.2. Medida de Atividade Lipolítica

A Atividade Lipolítica foi determinada de acordo com a metodologia descrita por MACEDO *et al.* (1997). O método utiliza uma emulsão de óleo de oliva e goma arábica. Os ácidos graxos liberados durante a reação da emulsão e o extrato enzimático foram titulados com NaOH 0,05N. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto.

A umidade das amostras foi determinada segundo a metodologia da AOAC (1995), para posterior conversão dos resultados para base seca.

2.3.3. Análise dos resultados

Para o processo de produção de lipase foi usado três Planejamentos Fatorial Completo 3², um para cada condição nutricional (sem fonte adicional de carbono, óleo de soja e óleo diesel), totalizando 27 ensaios. As variáveis estudadas foram o tempo de fermentação e aeração do meio. Os níveis de variação do Planejamento são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Níveis de variação do Planejamento Fatorial Completo 3² utilizado para produção de lipase.

Variáveis	- 1	0	+ 1
TF	72	96	120
V	0	60	120

TF: Tempo de fermentação (h); V: Aeração ($\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

3. Resultados e Discussão

A análise apresentada na Tabela 2 mostra que as variáveis que apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) no processo de produção de lipase foram o tempo de fermentação e a aeração do meio nos experimentos sem fonte adicional de carbono e óleo diesel, respectivamente.

Tabela 2. Efeitos das variáveis sobre o processo de produção de lípase para os experimentos sem fonte adicional de carbono, óleo de soja e óleo diesel.

FAC	Variáveis	Efeito	p
Sem FAC	TF (L)	-24,46	0,014*
	TF (Q)	25,34	0,055
	V (L)	-8,50	0,175
	V (Q)	-3,93	0,669
	TF(L) x V(L)	-2,78	0,668
Óleo de soja	TF (L)	25,93	0,101
	TF (Q)	-12,51	0,561
	V (L)	-9,83	0,441
	V (Q)	-6,05	0,774
	TF(L) x V(L)	10,07	0,512
Óleo diesel	TF (L)	-11,72	0,062
	TF (Q)	-10,66	0,225
	V (L)	-32,79	0,004*
	V (Q)	40,89	0,010*
	TF(L) x V(L)	-3,48	0,533

FAC: Fonte adicional de carbono; V: Aeração; TF: Tempo de fermentação; (L): Linear; (Q): quadrático; (*) Valores significativos, $p < 0,05$.

Na avaliação da produção de lipase a utilização da metodologia de superfície de resposta permitiu verificar a influência das variáveis mais significativas no seu processo de produção. A Figura 2 mostra o perfil de Atividade Lipolítica encontrado para diferentes condições utilizadas. Observa-se que o aumento do tempo de fermentação nos experimentos sem fonte adicional de carbono diminui a eficiência do processo de produção da lipase, pois o efeito apresentado por esta variável foi negativo. Este comportamento pode ser verificado na Figura 2a.

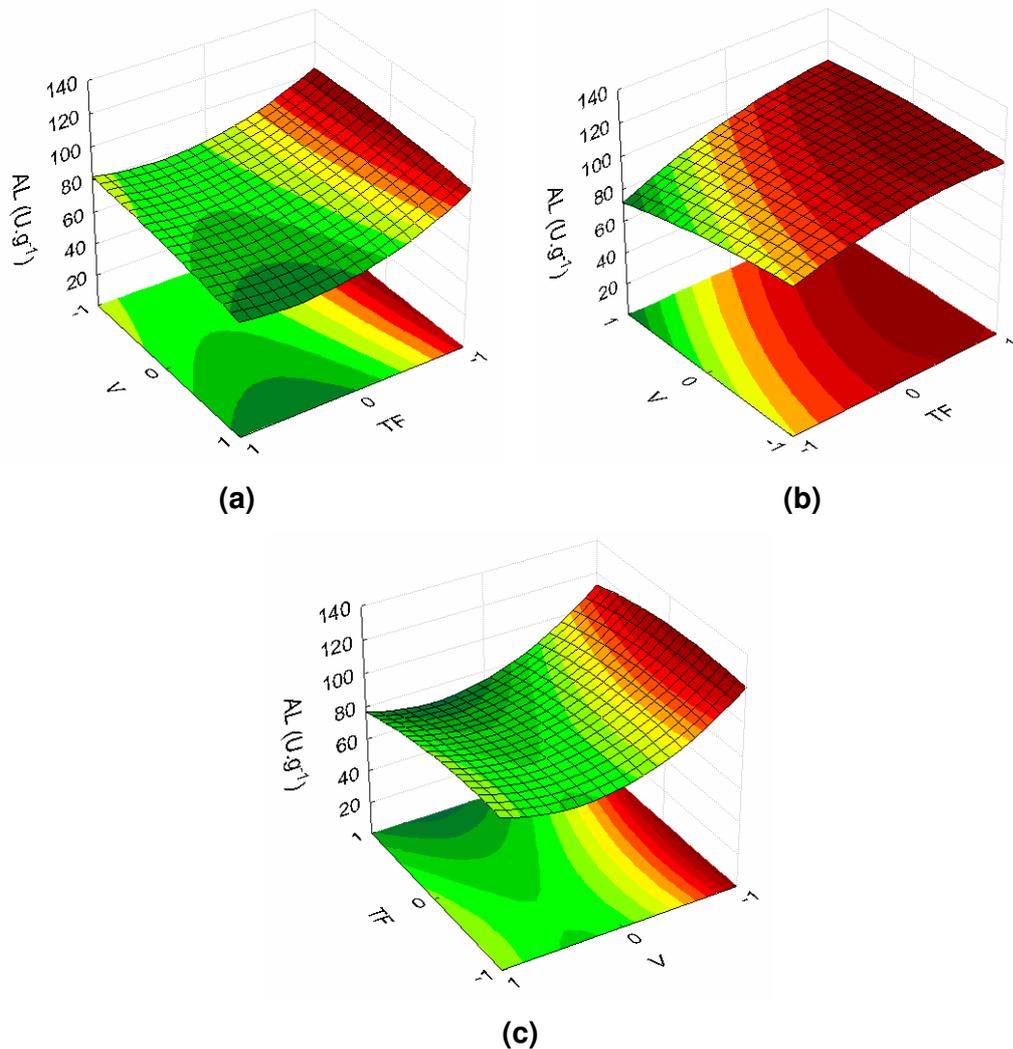


Figura 2. Perfil de Atividade Lipolítica (AL) para os experimentos (a) sem fonte adicional de carbono, (b) óleo de soja e (c) óleo diesel em função das variáveis codificadas para aeração (V) e tempo de fermentação (TF).

Os níveis de oxigênio disponíveis no meio de fermentação são um dos fatores responsáveis pela atividade metabólica do microrganismo, afirmam HONGZHANG *et al.*, (2002), além disso os autores explicam que o uso de altas taxas de ar pode diminuir a umidade do meio de fermentação, comprometendo o processo

de produção. Esta observação também foi verificada no presente trabalho, alcançando reduções de umidade em até 25,9% quando se utilizou $120 \text{ mL}_{\text{ar.g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}}$ e óleo de soja. A aeração nos experimentos adicionados de óleo diesel foram os que apresentaram efeito significativo, onde os melhores resultados foram encontrados sem aeração ($124,22 \text{ U.g}^{-1}$ em 96h), mostrando o potencial de produção da enzima com menor custo.

Durante as fermentações foi observado que os experimentos com $120 \text{ mL}_{\text{ar.g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}}$ apresentaram maior velocidade de esporulação, indicando possivelmente o maior crescimento celular, porém este comportamento não proporcionou maior produção de lipase. Isto mostra que a produção da enzima não apresenta uma relação direta com o crescimento microbiológico nas condições estudadas. ELIBOL & OZER (2000) quando estudaram a influencia da aeração na produção de lipase por *Rhizopus arrhizus* verificaram que a produção desta apresentou uma relação intrínseca com a taxa de aeração e não com o crescimento celular.

Apesar do efeito do tempo de fermentação e da aeração para os experimentos com óleo de soja não serem significativos ($p < 0,05$), a produção de lipase pode ser influenciada quando não se fornece aeração no decorrer do tempo de fermentação. Este comportamento está mostrado na Figura 2b.

As maiores Atividades Lipolítica encontradas foram $105,34 \text{ U.g}^{-1}$ em 72h e $60 \text{ mL}_{\text{ar.g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}}$, $119,46 \text{ U.g}^{-1}$ em 120h com $60 \text{ mL}_{\text{ar.g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}}$ e $127,22 \text{ U.g}^{-1}$ em 96h sem aeração para os experimentos sem fonte adicional de carbono, óleo de soja e óleo diesel, respectivamente. Avaliando os resultados encontrados pode-se verificar que as melhores atividades Lipolítica foram encontradas nos experimentos com fonte adicional de carbono, mostrando com isso seu efeito sinérgico sobre a produção de lipase. No caso dos experimentos com óleo de soja, MAREK & BEDNARSKI (1996) afirmam que a presença de triglicerídios e ácidos graxos são responsáveis pelo aumento da produção de enzimas lipolíticas pelo microrganismo.

Com relação as altas atividades enzimáticas para os experimentos com óleo diesel, KAMINI *et al.*, (1998) e CORDOVA *et al.*, (1998) estudaram a produção de lipase e verificaram que a presença de hidrocarbonetos no meio de cultivo favoreceu a produção da enzima. Segundo DOMÍNGUEZ *et al.*, (2003) e SHARMA *et al.*, (2001), a produção de lipase pode ser influenciada não só pela presença, mas o tipo de hidrocarboneto, pois o mecanismo de biossíntese está ligado ao tipo de microrganismo em que se fornecem estas fontes.

Apesar do tempo de fermentação não ter influenciado significativamente ao nível de confiança de 95% no processo de produção de lipase com óleo diesel (efeito linear, $p=0,062$), os melhores resultados foram encontrados nos menores tempos de fermentação, mostrando que não há necessidade de tempos muito longos para produção da lipase em fermentação em estado sólido.

4. Conclusões

A aeração e o tempo de fermentação apresentaram efeitos significativos ($p<0,05$) nos resultados de Atividade Lipolítica para os experimentos com óleo diesel e sem fonte adicional de carbono, respectivamente. A utilização de $120 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ favoreceu o crescimento do microrganismo, mostrando que este apresenta relação com o fornecimento de ar no meio de fermentação.

As fontes adicionais de carbono utilizadas nos experimentos atuaram como indutor da produção de lipase, onde os resultados encontrados foram 105,34; 119,46 e 127,22 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ para os experimentos sem fonte adicional de carbono óleo de soja e óleo diesel, respectivamente. A utilização de óleo diesel, sem o fornecimento de ar durante 96h de fermentação foram as melhores condições encontradas para produção de lipase utilizando substratos de baixo custo, com *Aspergillus fumigatus*.

Tendo em vista a busca por tecnologias simples, bem como a minimização dos custos de produção, os resultados encontrados mostram que o processo de produção da lipase a partir do uso de resíduos das indústrias de arroz é uma alternativa promissora, pois tais resíduos podem ser facilmente adquiridos.

5. Referências Bibliográficas

AOAC. **Official Methods of Analysis of International**. 16th Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.

BURKERT, J.F.M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**. v. 91, p. 77-84, 2004.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**. v. 71, p. 45-50, 2000.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**. São Paulo. v. 18, p. 544-554, 1995.

CHRISTAKOPOULOS, P.; TZIA, C.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of extracellular lipase from *Calvatia gigantea*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 38, p. 194-197, 1992.

CIAFARDINI, G.; ZULLO, B.A.; IRIDE, A. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. **Food Microbiology**. v. 23, p. 60-67, 2006.

CORDOVA J.; NEMMAOUI, M.; ISMAÝLI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S. RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 5, p. 75-78, 1998.

DOMÍNGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M.A.; SANROMÁN, A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**. v. 25, p. 1225–1229, 2003.

ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**. v. 36, p. 325–329, 2000.

HASAN, S. D. M.; COSTA, J. A. V.; SANZO, A. V. L. Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnology Techniques**. v. 12, n. 10, p. 787–791, 1998.

HATZINIKOLAOU, D. G.; MACRIS, J. B.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; KOLISIS, F. N.; FOUNTOUKIDIS. Production and parcial characterization of lipase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**. 18, 547-552, 1996.

HIOL, A.; JONZO, M. D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus*

oryzae strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26, 421-430, 2000.

HONGZHANG, C.; FUJIAN, X.; ZHONGHOU, T.; ZUOHU, L. A Novel Industrial-Level Reactor with Two Dynamic Changes of Air for Solid-State Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 93, n. 2, p. 211-214, 2002.

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

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. Editors. **Industrial Biotransformations**. Weinheim: Wiley – VCH, 2000.

LONG, K.; GHAZALI, H. M.; ARIFF, A.; AMPON, K.; BUCKE, C. Mycelium bound lipase from a locally strain of *Aspergillus flavus* link: pattern and factors involved in its production. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**. v. 67, p. 157-163, 1996.

MACÊDO, G.A.; PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Journal of the Brazilian Society for Microbiology** v. 28, p. 90-95, 1997.

MAREK, A.; BEDNARSKI, W. Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi. **Biotechnology Letters**. v. 18, p. 1155-1160, 1996.

MURALIDHAR, R. V.; CHIRUMAMILA, R. R.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. **Biochemical Engineering Journal**. v. 9, p. 17-23, 2001.

OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; CASTRO, H. F.; MEI, L. H. I. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**. v. 23, n. 5, p. 632-636, 2000.

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

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

POKORNY, D.; FRIEDRICH, J.; CIMERMAN, A. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**. v. 16, p. 363-366, 1994.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**. v. 19, p. 627-62, 2001.

YOU LI, C.; CHENG, C. Y.; CHEN, T. L. Fed – batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. **Biochemical Engineering Journal**. v. 19, p. 25-31, 2004.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Os modelos matemáticos de produção de biossurfactante referente aos experimentos sem fonte adicional de carbono apresentou Atividade Emulsificante $8,03 \text{ UE.g}^{-1}$ nas condições de $90 \text{ mL}_{\text{ar.g}_{\text{meio}}^{-1}.\text{h}^{-1}}$ e 104h de fermentação, e o modelo utilizando óleo diesel, $7,85 \text{ UE.g}^{-1}$ em $100 \text{ mL}_{\text{ar.g}_{\text{meio}}^{-1}.\text{h}^{-1}}$ e 111h de fermentação. Estes resultados foram validados experimentalmente, onde apresentaram, respectivamente, $8,59$ e $8,03 \text{ UE.g}^{-1}$ (sem fonte adicional de carbono) e $8,28$ e $7,85 \text{ UE.g}^{-1}$ (utilizando óleo diesel).

Os modelos desenvolvidos para produção de lipase seguem as tendências dos resultados experimentais. Os resultados da otimização numérica foram, $100,31 \text{ U.g}^{-1}$ em 103h, $117,02 \text{ U.g}^{-1}$ em 90h e $124,12 \text{ U.g}^{-1}$ em 119h, respectivamente, para os experimentos sem fonte adicional de carbono, óleo de soja e óleo diesel. A utilização de óleo de soja torna uma alternativa promissora na produção de lipase, visto que alcançou 94,27% da Atividade Lipolítica máxima encontrada nos experimentos com óleo diesel em 29h antes.

Na produção de biossurfactante os resultados de Atividade Emulsificante apresentaram diferenças significativas tanto para as vazões de ar como para as diferentes fontes adicionais de carbono utilizadas. A condução dos experimentos até 120h foi a condição que proporcionou os melhores resultados de Atividade Emulsificante, onde se verificou a existência de 4 grupos de experimentos com comportamentos de produção diferentes. Grupo 1, experimentos sem aeração e com $200 \text{ mL}_{\text{ar.g}_{\text{meio}}^{-1}.\text{h}^{-1}}$; Grupo 2, 60 e $100 \text{ mL}_{\text{ar.g}_{\text{meio}}^{-1}.\text{h}^{-1}}$; Grupo 3, $40 \text{ mL}_{\text{ar.g}_{\text{meio}}^{-1}.\text{h}^{-1}}$; e Grupo 4, $120 \text{ mL}_{\text{ar.g}_{\text{meio}}^{-1}.\text{h}^{-1}}$. A Atividade Emulsificante encontrada na otimização foi $11,17 \text{ UE.g}^{-1}$ para o meio sem fonte adicional de carbono e aeração $148 \text{ mL}_{\text{ar.g}_{\text{meio}}^{-1}.\text{h}^{-1}}$.

Na produção de lipase, as vazões de ar fornecidas, bem como as fontes adicionais de carbono influenciaram significativas ($p < 0,05$) nos resultados de Atividade Lipolítica. Os melhores valores de produção foram encontrados nos experimentos sem o fornecimento de ar, sendo que a utilização de $120 \text{ mL}_{\text{ar.g}_{\text{meio}}^{-1}.\text{h}^{-1}}$ favoreceu o crescimento do microrganismo, mostrando que este apresenta relação com o fornecimento de ar no meio de fermentação. As fontes adicionais de carbono utilizadas nos experimentos atuaram como indutor da produção de lipase, onde os resultados encontrados foram $93,59$, $102,0$ e $110,95 \text{ U.g}^{-1}$ para os experimentos sem fonte, com óleo de soja e óleo diesel, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNA, L. M. M. S. **Produção de biossurfactantes do tipo raminolípídeo por *Pseudomonas* sp.** Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro/RJ, 2000.

ANNA L.M.S.; SEBASTIAN G.V.; MENEZES E.P.; ALVES T.L.M.; SANTOS A.S.; PEREIRA N.; FREIRE D.M.G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 19, n. 2, p. 159–166, 2002.

AOAC. **Official Methods of Analysis of International**. 16th Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.

BANAT, P. I.M., Lês biosurfactants plus que jamais sollicités, Biofutur, 198, 45, mars 2000.

BANAT, I. M., MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S. S. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, 53, p.495-508, 2000.

BANAT, I. M. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. **Biotechnology Letters**. v. 15, 591-594, 1993.

BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F. R. TÓTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 868-875, 2006.

BHUSHAN, B.; DOSANJH, N. S.; HOONDAL, G. S. Lipase production from an alkalophilic yeast sp. by solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**. v.16, p. 841–842, 1994.

BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**. v. 30, p. 231–236, 1999.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces*. v. 152, p. 41-52, 1999.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**. v. 74, p. 63-67, 2000.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Volume 2, São Paulo/SP, Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A. **Tecnologia das Fermentações**. Volume 1, São Paulo/SP, Editora da Universidade de São Paulo, 1975.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp using factorial design. **Bioresource Technology**. v. 91, p. 77-84, 2004.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**. v. 7, p. 262–266, 2004.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA, J. G. L.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**. v.4, p. 239–247, 2000.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**. São Paulo. v. 18, p. 544-554, 1995.

CHAMPION, J. T.; GILKEY, J. C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R. M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 170, p. 569-574, 1995.

CHRISTAKOPOULOS, P.; TZIA, C.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of extracellular lipase from *Calvatia gigantea*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 38, p. 194-197, 1992.

CIAFARDINI, G.; ZULLO, B.A.; IRIDE, A. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. **Food Microbiology**. v. 23, p. 60-67, 2006.

COOPER, DG. Biosurfactants. **Microbiological Sciences**. v. 3, n. 5, p. 145-149, 1986.

CORDOVA J.; NEMMAOUI, M.; ISMAÝLI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S. RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 5, p. 75-78, 1998.

CORSANO, G.; AGUIRRE, P. A.; IRIBARREN, O. A.; MONTAGNA, J. M. Batch Fermentation Networks Model for Optimal Synthesis, Design, and Operation. **Industrial and Engineering Chemistry Research**. v. 43, p. 4211 – 4219, 2004.

COSTA, J. A. V. **Produção de Amiloglicosidase por Fermentação em Estado Sólido em Biorreator de Coluna**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP, 1996.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**. v. 22, p. 211-219, 2005.

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G.; PEREIRA, D. Biorremediação: Tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**. v. 30, p. 32-37, 2002.

DAKHMUCHE, S. D.; AOULMI, Z. G.; MERAIHI, Z.; BENNAMOUN, L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **Journal of Food Engineering**. v. 73, p. 190-197, 2006.

DOMÍNGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M.A.; SANROMÁN, A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**. v. 25, p. 1225-1229, 2003.

DURAND, A.; RENAUD, R.; ALMANZA, S.; MARATRAY, J.; DIEZ, M.; DESGRANGES, C. Solid-state fermentation reactors: from lab scale to pilot plant, **Biotechnology Advances**. v. 11, p. 591-597, 1993.

DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of Microbial Surfactants. **Biotechnology Advances**. v. 9, p. 241-252. 1991.

ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**. v. 36, p. 325-329, 2000.

FIECHTER A. Biosurfactantes: moving towards industrial application. **Trends in Food Science and Technology**. v. 31, p. 283-293, 1992.

FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**. v. 75. p. 235–240; 2000.

FROST & SULLIVAN. Market Forecast: Microbial Biosurfactants. **Industrial Bioprocessing**. p. 1, 2002

GANDHI, N. N. Application of lipases. **Journal of the American Oil Chemists Society**. . 74, n. 6, p. 621-634, 1997.

GOMBERT, A. K.; PINTO, A.L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Proc. Biochem**. v. 35, p. 85–90, 1999.

GUTIERREZ, R. M.; HUERTA-OCHOA, S.; ULIBARRI, R. L.; CASTANEDA, G. S.; TORREZ, E. F.; GONZALES, G. V. **Solid state fermentation in bioconversion of agro-industrial raw materials**. 1992.

HARVEY, S.; ELASHVILLI, I.; VALDES, J. J.; KAMELY, D.; CHAKRABARTY, M. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by microbial surfactant. **Biotechnology**. v. 8, p. 228-230, 1990.

HASAN, S. D. M.; COSTA, J. A. V.; SANZO, A. V. L. Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnology Techniques**. v. 12, n. 10, p. 787–791, 1998.

HATZINIKOLAOU, D. G.; MACRIS, J. B.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; KOLISIS, F. N.; FOUNTOUKIDIS. Production and partial characterization of lipase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**. v. 18, p. 547-552, 1996.

HESELTIME, C. W., Biotechnology report: solid state fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**. v.14, p. 517-532, 1972.

HIOL, A.; JONZO, M. D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26, 421-430, 2000.

HODGSON, B. J.; TAYLOR, C. N.; USHIO, M.; LEIGH, J. R.; KALGANOVA, T.; BAGANZ, F. Intelligent modelling of bioprocesses: a comparison of structured and unstructured approaches. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 26, n. 6, p. 353-359, 2004.

HONGZHANG, C.; FUJIAN, X.; ZHONGHOU, T.; ZUOHU, L. A Novel Industrial-Level Reactor with Two Dynamic Changes of Air for Solid-State Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 93, n. 2, p. 211-214, 2002.

IGNÁCIO, A. A. V.; FILHO, V. J. M. F. O uso de software de modelagem AIMMS na solução de problemas de programação matemática. **Pesquisa Operacional**. v. 24, n.1, 2004.

INOH, Y.; KITAMOTO, D.; HIRASHIMA, N.; NAKANISHI, M. Biosurfactant MEL-A dramatically increases gene transfection via membrane fusion. **Journal of Controlled Release**. v. 94, p. 423–431, 2003.

JIA, X.; ZHANG, T.; WANG, F.; HAN, F. Multi-objective modeling and optimization for cleaner production processes. **Journal of Cleaner Production**. v. 14, p. 146-151, 2006.

JOHNSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; SISTA, V.; YADAV, N. K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **Biotechnology Letters**. 14, 6, 487-490, 1992.

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

KANWAR, L.; GOGOI, B. K.; GOSWAMI, P. Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. **Bioresource Technology**. v. 84, p. 207–211, 2002.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Bangalore: Current Science**. v. 77, n. 1, p. 116-126, 1999.

KIM, H.; JEON, J.; LEE, H.; PARK, Y.; SEO, W.; OH, H.; KATSURAGI, T.; TANI, Y.; YOON, B. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**. v. 24, p. 225-229, 2002.

KIM, S. G.; LIM, E. J.; LEE, S. O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L – 417. **Biotechnology Applied Biochemistry**. v. 31, p. 249-253, 1997.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C., Biosurfactants and Biotechnology. **Surfactants science series**. New York: Marcel Dekker, v. 25, 1987.

KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T. FRANKE, P.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 204, p. 1-8, 1998.

LANG, S. Biological Amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion I Colloid & Interface Science**. v. 7, p. 12-20, 2002.

LANG, S.; WULLBRANDT. Rhamnose lipids- biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 51, p. 22-32, 1999.

LENZ, J.; HÖFER, M.; KRASENBRINK, J.-B.; HÖLKER, U. A survey of computational and physical methods applied to solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 65, p. 9-17, 2004.

LEVIŠAUSKAS, D.; GALVANAUSKAS, V.; ŽUNDA, G.; GRIGIŠKIS, S. Model-based optimization of biosurfactant production in fed-batch culture *Azotobacter vinelandii*. **Biotechnology Letters**. v. 26, p. 1141-1146, 2004.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. Editors. **Industrial Biotransformations**. Weinheim: Wiley – VCH, 2000.

LIMA, A. S. **Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica***. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP, 1996.

LONG, K.; GHAZALI, H. M.; ARIFF, A.; AMPON, K.; BUCKE, C. Mycelium bound lipase from a locally strain of *Aspergillus flavus* link: pattern and factors involved in its production. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**. v. 67, p. 157-163, 1996.

MACÊDO, G.A.; PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Journal of the Brazilian Society for Microbiology** v. 28, p. 90-95, 1997.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new application. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 58, p. 428-434, 2002.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. Champaign: **Journal of Surfactants and Detergents**. v. 2, n. 2, p. 237-241, 1999.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Surfactants and Detergents**. v. 20, p. 48-52, 1998.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 18, p. 37-42, 1997.

MAREK, A.; BEDNARSKI, W. Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi. **Biotechnology Letters**. v. 18, p. 1155-1160, 1996.

MATURA, A.; FERRER, J.C. & BARAÑAO, F. Design and implementation-based decision support system generator. **European Journal of Operational Research**. v. 154, p. 170-183, 2004.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; JÚNIOR, A. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**. v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, B.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. v. 68, p. 61-138, 2003.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**. v. 35, p. 1211-1225, 2000.

MORAES, A. F. **Enriquecimento protéico do farelo de arroz por fermentação semi-sólida em biorreator de coluna com leito fixo**. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande/RS, 1999.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1488. 211-218. 2000.

MORIKAWA, M.; ITO, M.; IMANAKA, T. Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-I, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, psf-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 74, p. 255-261, 1992.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**. v. 60, p. 371-380, 2001.

MURALIDHAR, R. V.; CHIRUMAMILA, R. R.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. **Biochemical Engineering Journal**. v. 9, p. 17-23, 2001.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**. v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; CASTRO, H. F.; MEI, L. H. I. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**. v. 23, n. 5, p. 632-636, 2000.

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

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

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

PANDEY, A. Aspects of fermenter design for solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 26, p. 335-361, 1991.

POKORNY, D.; FRIEDRICH, J.; CIMERMAN, A. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**. v. 16, p. 363-366, 1994.

PUTHLI, M. S.; RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. v. 27, p. 287-294, 2006.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Volume 3. Editora e Gráfica Universitária – UFPEL. Pelotas/RS, 2000.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Volume 1. Editora e Gráfica Universitária – UFPEL. Pelotas/RS, 1996.

RIVERAMUNOZ, G.; TINOCOVALENCIA, J.; SANCHEZ, S.; FARRER, A. Microbial lipases in a solid-state fermentation system. **Biotechnology Letters**. v. 13, p. 277–280, 1991.

ROBERT, M.; MERCADE, M. E.; BOSCH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T 1. **Biotechnology Letters**. v. 11, p. 871-874, 1989.

RODRIGUES, L.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R.; MEI, H. C. V. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 1-10, 2006.

ROHNER, M.; MEYER H. P. Applications of modelling for bioprocess design and control in industrial production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 13, n. 2, p. 69 – 78, 1995.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactantes. **Environmental Microbiology**. v. 3, p. 229-236, 2001.

ROYCE, P.N. A Discussion of Recent Developments in Fermentation Monitoring and Control from a Practical Perspective. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**. v. 13. n. 2, p. 117-149, 1993.

SAMPAIO, R. M. **Estudo da produção de bioemulsificante de saccharomices lipolytica por fermentação em óleo-diesel comercial**. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP, 1995.

SANDOVAL, J.C.M.; KARNS, J.; TORRENTS, A. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. **Journal of Chromatography A**. v. 864, p. 211 – 220, 1999.

SHAFI, R.; KHANNA, S. Biosurfactants. **Indian Journal of Microbiology**, n. 33, p. 163-184, 1995.

SEN, R. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. **J Chem Technol Biotechnol**. v. 68, p. 263-270, 1997.

SHARMA, R.; CHRISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**. 19, 627-662, 2001.

SHIN, K. H.; KIM K. W. A biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of phenanthrene and diesel in sand. **Environmental Geochemistry and Health**. v. 26, p. 5-11, 2004.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **TRENDS in Biotechnology**. v. 22, n. 3, p. 142–146, 2004.

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

SMITS, J. P.; VAN SONSBECK, H. M.; TRAMPER, J.; KNOL, W.; GEELHOED, W.; PEETERS, M.; RINZEMA, A. Modelling fungal solid-state fermentation: the role of inactivation kinetics. **Bioprocess Engineering**. v. 20, p. 391-404, 1999.

STRACK, J. GPSS: Modelagem e simulação de sistemas. Editora livros técnicos e científicos. 174 p., Rio de Janeiro, 1984.

SULLIVAN, E. R. Molecular genetics of biosurfactant production. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 9, p. 263-269, 1998.

TREVA M. D. T., BOFFEY S., GOULDING K. H., STANBURYK P.; Biotecnología: Principios biológicos; Editorial Acribia, S. A.; Zaragoza – España, 284 p.;1990.

TSONEVA, R.G.; PATARINSKA, T.D.; POPCHEV, I.P. Augmented Lagrange decomposition method for optimal control calculation of batch fermentation processes. **Bioprocess Engineering**. v. 18, p. 143 – 153 ” Springer-Verlag, 1998.

TURKOVSKAYA, O. V.; DMITRIEVA, T. V.; MURATOVA, A. Y. A Biosurfactant-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strain. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 37, n. 1, p. 71-75, 1999.

VANCE-HARROP M. H.; GUSMÃO N. B.; CAMPOS-TAKAKI G. M. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using d-glucose and babassu oil as carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**. v 34, p 120-123, 2003.

VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of Microbial Surfactants. **Biotechnology Advanced**. Vol. 9, p. 241-252, 1991.

VEENANADIG, N. K.; GOWTHAMAN, M. K.; KARANTH, N. G. K. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. **Bioprocess Engineering**. v. 22, p. 95-99, 2000.

WEI, Y.; LAI, H.; CHEN, S.; YEH, M.; CHANG, J. Biosurfactant production by *Serratia marcescens* SS-1 and its isogenic strain SM Δ R defective in SpnR, a quorum-sensing LuxR family protein. **Biotechnology Letters**. v. 26, p. 799-802, 2004.

ZHANG, Z.; SCHARER, J.M.; MOO-YOUNG M. Mathematical model for aerobic culture of a recombinant yeast. **Bioprocess Engineering**. v. 17, p. 235–240, 1997.

YOU LI, C.; CHENG, C. Y.; CHEN, T. L. Fed – batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. **Biochemical Engineering Journal**. 19, 25-31, 2004.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para continuidade dos estudos de modelagem e produção de biossurfactante são sugeridos os seguintes temas:

- Desenvolver e/ou padronizar métodos para o cálculo da velocidade específica de crescimento em fermentação em estado sólido;
- Desenvolver modelos matemáticos parametrizados em função de outras variáveis, tais como, consumo de substrato, velocidade específica de crescimento e concentração carbono;
- Quantificar o biossurfactante produzido por medida de tensão superficial (tensiômetro);
- Estudo comparativo da produção de biossurfactante em fermentação submersa e estado sólido;
- Identificação do biossurfactante produzido para cultivos submerso e estado sólido;
- Produção de biossurfactantes, utilizando efluentes industriais como fonte de carbono (indústrias processadoras de arroz e pescado);
- Aplicação do biossurfactante, produzido a partir dos efluentes, na biorremediação dos efluentes utilizados como fonte de carbono.

ANEXOS

Tabela 1. Resultados de Atividade Emulsificante (em UE.g⁻¹) para os experimentos sem fonte adicional de carbono nas diferentes condições de aeração.

t (h)	Aeração (mL _{ar} .g _{meio} ⁻¹ .h ⁻¹)					
	0	40	60	100	120	200
0	2,48	3,98	4,21	3,63	3,37	2,68
24	2,50	4,10	4,78	5,18	4,49	2,39
48	2,86	4,30	7,09	6,80	5,64	2,62
72	2,90	4,69	7,75	6,21	7,59	3,14
96	2,76	4,40	6,52	6,49	9,13	3,88
120	2,06	4,10	7,13	6,29	10,83	4,44
144	1,83	3,86	6,73	5,79	8,90	3,88

Tabela 2. Resultados de Atividade Emulsificante (em UE.g⁻¹) para os experimentos com óleo de soja nas diferentes condições de aeração.

t (h)	Aeração (mL _{ar} .g _{meio} ⁻¹ .h ⁻¹)									
	0	40	50	60	70	90	100	110	120	200
0	0,18	4,23	2,67	4,48	3,31	1,74	4,03	2,22	1,46	0,12
24	1,13	3,31	5,32	4,83	3,71	1,71	4,65	5,56	5,04	1,87
48	1,30	3,65	7,27	6,29	3,91	3,39	5,64	7,84	7,43	2,04
72	2,80	5,37	7,35	7,03	6,31	8,22	5,31	8,89	7,88	1,81
96	2,16	5,56	8,04	7,57	10,25	7,21	6,81	13,32	7,84	2,23
120	2,00	4,63	7,43	7,11	9,49	6,65	6,99	9,85	8,51	3,31
144	4,44	4,72	4,72	6,94	6,41	3,67	5,01	5,04	4,81	2,92

Tabela 3. Resultados de Atividade Emulsificante (em UE.g⁻¹) para os experimentos com óleo diesel nas diferentes condições de aeração.

t (h)	Aeração (mL _{ar} .g _{meio} ⁻¹ .h ⁻¹)					
	0	40	60	100	120	200
0	1,35	3,14	4,59	4,82	3,03	1,66
24	1,94	3,19	4,66	5,76	3,33	1,72
48	3,12	4,12	5,14	7,73	5,10	1,97
72	3,88	4,13	5,82	7,58	5,92	3,97
96	2,57	5,01	6,32	7,04	9,21	3,97
120	2,90	4,47	6,74	6,40	9,81	3,03
144	3,44	4,80	5,79	7,22	6,58	4,65

Tabela 4. Resultados de Atividade Lipolítica (em U.g⁻¹) para os experimentos sem fonte adicional de carbono nas diferentes condições de aeração.

t (h)	Aeração (mL _{ar} .g _{meio} ⁻¹ .h ⁻¹)								
	0	40	60	70	80	90	110	120	200
0	29,16	13,41	1,32	19,57	17,89	22,65	25,10	2,53	30,47
24	63,35	62,77	23,75	27,36	82,09	35,26	29,88	10,85	73,28
48	107,94	83,24	88,62	49,34	88,58	53,20	78,55	84,53	91,20
72	101,06	74,95	105,34	126,82	74,83	106,01	117,61	98,35	84,43
96	86,19	73,67	72,18	98,01	66,72	106,77	125,66	71,68	77,52
120	78,93	89,95	81,80	89,08	54,11	88,41	109,80	70,65	89,76
144	95,13	59,24	91,54	68,57	58,80	73,55	95,56	85,51	110,31

Tabela 5. Resultados de Atividade Lipolítica (em U.g⁻¹) para os experimentos com óleo de soja nas diferentes condições de aeração.

t (h)	Aeração (mL _{ar} .g _{meio} ⁻¹ .h ⁻¹)									
	0	40	50	60	70	80	90	110	120	200
0	27,62	14,82	7,92	0,00	7,77	17,10	8,30	19,60	8,65	30,02
24	78,06	50,89	29,98	21,43	34,13	75,43	74,73	36,66	24,15	68,32
48	106,90	73,58	125,08	72,87	99,44	87,30	116,94	127,27	80,36	93,34
72	93,40	98,74	117,53	72,48	112,63	79,26	101,76	136,70	81,68	78,20
96	112,29	77,65	111,60	106,82	121,30	58,27	123,99	116,69	86,11	81,30
120	98,74	82,66	108,26	119,46	108,06	58,02	95,80	100,32	107,16	98,19
144	92,56	67,25	110,47	56,74	80,85	59,43	93,38	70,46	36,40	98,45

Tabela 6. Resultados de Atividade Lipolítica (em U.g⁻¹) para os experimentos com óleo diesel nas diferentes condições de aeração.

T (h)	Aeração (mL _{ar} .g _{meio} ⁻¹ .h ⁻¹)					
	0	40	60	80	120	200
0	29,83	16,78	8,90	18,24	2,81	28,10
24	72,47	78,98	29,41	92,44	7,90	49,30
48	113,48	73,57	103,65	78,79	58,48	39,09
72	119,59	84,05	84,54	56,76	94,88	32,64
96	127,22	82,29	84,98	54,36	85,22	29,07
120	109,58	76,80	76,35	25,72	77,91	37,58
144	107,74	59,74	112,47	30,85	108,30	49,34

Tabela 7. Matriz do Planejamento Composto Central utilizado na otimização numérica da produção de biossurfactante sem fonte adicional de carbono.

V	TF	AE
-1	-1	7,65
1	-1	7,38
-1	1	7,36
1	1	7,82
0	0	8,03
0	0	8,02
-1,4142	0	7,33
0	1,4142	7,58
1,4142	0	7,58
0	-1,4142	7,56

V: Aeração ($\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); TF: Tempo de fermentação; AE: Atividade Emulsificante ($\text{UE} \cdot \text{g}^{-1}$).

Tabela 8. Matriz do Planejamento Composto Central utilizado na otimização numérica da produção de biossurfactante com óleo diesel.

V	TF	AE
-1	-1	7,52
1	-1	7,09
-1	1	7,23
1	1	7,24
0	0	7,84
0	0	7,85
-1,4142	0	7,07
0	1,4142	7,33
1,4142	0	7,03
0	-1,4142	7,57

V: Aeração ($\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); TF: Tempo de fermentação; AE: Atividade Emulsificante ($\text{UE} \cdot \text{g}^{-1}$).

Tabela 9. Matriz do Planejamento Composto Central utilizado na otimização numérica da produção de lipase sem fonte adicional de carbono.

V	TF	AL
-1	-1	95,60
1	-1	94,20
-1	1	92,49
1	1	96,42
0	0	100,31
0	0	100,32
-1,4142	0	98,93
0	1,4142	89,95
1,4142	0	99,23
0	-1,4142	90,30

V: Aeração ($\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); TF: Tempo de fermentação; AL: Atividade Lipolítica ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tabela 10. Matriz do Planejamento Composto Central utilizado na otimização numérica da produção de lipase com óleo de soja.

V	TF	AL
-1	-1	102,98
1	-1	108,27
-1	1	104,88
1	1	107,25
0	0	117,02
0	0	117,03
-1,4142	0	106,12
0	1,4142	99,78
1,4142	0	114,35
0	-1,4142	100,48

V: Aeração ($\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); TF: Tempo de fermentação; AL: Atividade Lipolítica ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tabela 11. Matriz do Planejamento Composto Central utilizado na otimização numérica da produção de lipase com óleo diesel.

V	TF	AL
-1	-1	68,66
1	-1	100,07
-1	1	24,23
1	1	120,11
0	0	124,12
0	0	124,13
-1,4142	0	44,07
0	1,4142	115,49
1,4142	0	108,57
0	-1,4142	115,00

V: Aeração ($\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); TF: Tempo de fermentação; AL: Atividade Lipolítica ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tabela 12. Matriz do Planejamento Fatorial 2^2 com duplicata no ponto central utilizado na validação experimental do modelo de produção de biossurfactante sem fonte adicional de carbono.

V	TF	AE
-1	-1	8,16
+1	-1	6,76
-1	+1	5,60
+1	+1	4,20
0	0	8,52
0	0	8,67

V: Aeração ($\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); TF: Tempo de fermentação; AE: Atividade Emulsificante ($\text{UE} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tabela 13. Matriz do Planejamento Fatorial 2^2 com duplicata no ponto central utilizado na validação experimental do modelo de produção de biossurfactante com óleo diesel.

V	TF	AE
-1	-1	3,42
+1	-1	6,13
-1	+1	4,93
+1	+1	2,92
0	0	9,72
0	0	6,85

V: Aeração ($\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); TF: Tempo de fermentação; AE: Atividade Emulsificante ($\text{UE} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tabela 14. Matriz do Planejamento Fatorial 2^2 com duplicata no ponto central utilizado na validação experimental do modelo de produção de lipase sem fonte adicional de carbono.

V	TF	AL
-1	-1	131,98
+1	-1	140,33
-1	+1	116,14
+1	+1	120,46
0	0	140,62
0	0	140,93

V: Aeração ($\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); TF: Tempo de fermentação; AL: Atividade Lipolítica ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tabela 15. Matriz do Planejamento Fatorial 3^2 utilizado na produção de lipase sem fonte adicional de carbono.

V	TF	AL
0	-1	86,19
0	1	71,68
-1	1	98,35
1	0	81,8
-1	0	105,34
1	1	70,65
0	0	72,18
-1	-1	101,06
1	-1	78,93

V: Aeração ($\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); TF: Tempo de fermentação; AL: Atividade Lipolítica ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tabela 16. Matriz do Planejamento Fatorial 3^2 utilizado na produção de lipase com óleo se soja.

V	TF	AL
0	-1	112,29
0	1	86,11
-1	1	81,68
1	0	119,46
-1	0	72,48
1	1	107,16
0	0	106,82
-1	-1	93,4
1	-1	98,74

V: Aeração ($\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); TF: Tempo de fermentação; AL: Atividade Lipolítica ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tabela 17. Matriz do Planejamento Fatorial 3^2 utilizado na produção de lipase com óleo diesel.

V	TF	AL
0	-1	127,22
0	1	85,22
-1	1	94,88
1	0	76,35
-1	0	84,54
1	1	77,91
0	0	84,98
-1	-1	119,59
1	-1	109,58

V: Aeração ($\text{mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); TF: Tempo de fermentação; AL: Atividade Lipolítica ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)

PROGRAMAS

PROGRAMA 1: *Ajuste polinomial dos resultados de Atividade Emulsificante e Lipolítica.*

EXEMPLO: *Ajuste polinomial para Atividade Emulsificante utilizando óleo diesel e aeração de $100 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.*

clear

% entrada dos dados; (Tempo de fermentação)

X(1) = 0;

X(2) = 24;

X(3) = 48;

X(4) = 72;

X(5) = 96;

X(6) = 120;

X(7) = 144;

%entrada com os valores de AE (Atividade Emulsificante)

y(1) = 4.82;

y(2) = 5.76;

y(3) = 7.73;

y(4) = 7.58;

y(5) = 7.04;

y(6) = 6.40;

y(7) = 7.22;

%y = log(y)

% m é o número de pontos

m = 7;

% inicializando os valores dos somatórios que serão os elementos da matriz A

SX1 = 0;

SX2 = 0;

SX3 = 0;

SX4 = 0;

Sy = 0;

Sy2 = 0;

SXy = 0;

SX2y = 0;

% somatórios dos Elementos da matriz A

for i=1:m

 SX1 = SX1 + X(i);

 SX2 = SX2 + X(i)*X(i);

 SX3 = SX3 + X(i)^3;

 SX4 = SX4 + X(i)^4;

 Sy = Sy + y(i);

 Sy2 = Sy2 + y(i)*y(i);

 SXy = SXy + X(i) * y(i);

 SX2y = SX2y + X(i)* X(i) * y(i);

end

```
%Matriz A
```

```
A = [ m SX1 SX2  
      SX1 SX2 SX3  
      SX2 SX3 SX4];
```

```
% Matriz B transposta para poder obter a solução do sistema
```

```
B = [Sy, SXy, SX2y]';
```

```
% Resolução do Sistema
```

```
C = A\B
```

```
%Calculo de R2
```

```
Sn1 = C(1) * (Sy - m * Sy / m);
```

```
Sn2 = C(2) * (SXy - SX1 * Sy / m);
```

```
Sn3 = C(3) * (SX2y - SX2 * Sy / m);
```

```
R2 = (Sn1 + Sn2 + Sn3) / (Sy2 - Sy * Sy / m)
```

```
y1 = C(1) + C(2) .* X + C(3) .* X.^2
```

```
y = y;
```

```
plot(X,y, X,y1)
```

PROGRAMA 2: Programa para o cálculo dos parâmetros a1 e a2, referentes a função trigonométrica à serem utilizadas nos Modelos de Atividade Emulsificante e Lipolítica.

EXEMPLO: Utilizando resultados de Atividade Emulsificante utilizando óleo diesel.

```
clear
```

```
% x1 representa a aeração
```

```
x1(1) = 0.00001;  
x1(2) = 40.0;  
x1(3) = 60.0;  
x1(4) = 100.0;  
x1(5) = 120.0;  
x1(6) = 200.0;
```

```
a2new = 0.0;  
a1new = 0.0;  
r2new = 0.0;
```

```
for a2=1.0:0.01:5.0  
    for a1 = 1.0:0.01:5.0
```

```
        X = sin(a1.*(log(a2.*x1)));
```

```
        %coeficientes C(1)
```

```
        y(1) = 1.409999999999 ;  
        y(2) = 2.96904761904 ;  
        y(3) = 4.27928571428 ;  
        y(4) = 4.95642857142 ;  
        y(5) = 2.06523809523 ;  
        y(6) = 1.41166666666 ;
```

```
        % m eh o numero de pontos
```

```
        m = 6;
```

```
        % inicializando os valores dos somatórios que serão os elementos da matriz A
```

```
        SX1 = 0;
```

```
        SX2 = 0;
```

```
        SX3 = 0;
```

```
        SX4 = 0;
```

```
        Sy = 0;
```

```
        Sy2 = 0;
```

```
        SXy = 0;
```

```
        SX2y = 0;
```

```

% somatórios dos Elementos da matriz A
for i=1:m
    SX1 = SX1 + X(i);
    SX2 = SX2 + X(i)*X(i);
    SX3 = SX3 + X(i)^3;
    SX4 = SX4 + X(i)^4;
    Sy = Sy + y(i);
    Sy2 = Sy2 + y(i)*y(i);
    SXy = SXy + X(i) * y(i);
    SX2y = SX2y + X(i)* X(i) * y(i);
end

%Matriz A
A = [ m SX1 SX2
      SX1 SX2 SX3
      SX2 SX3 SX4];

% Matriz B transposta para poder obter a solução do sistema
B = [Sy, SXy, SX2y]';

% Resolução do Sistema
C = A\B;

%Calculo de R2
Sn1 = C(1) * (Sy - m * Sy / m);
Sn2 = C(2) * (SXy - SX1 * Sy / m);
Sn3 = C(3) * (SX2y - SX2 * Sy / m);

R2 = (Sn1 + Sn2 + Sn3) / (Sy2 - Sy * Sy / m);

if r2new < R2
    r2new = R2
    a2new = a2
    a1new = a1
end
end
end

```

```

% matriz calculada da AE
y1 = C(1) + C(2) .* X + C(3) .* X.^2;

% matriz de entrada da AE para comparação com o AE calculado
y = y;
plot(X,y1,X,y);

```

PROGRAMA 3: Modelo final para Atividade Emulsificante e Lipolítica.

EXEMPLO: Modelo para Atividade Emulsificante utilizando óleo diesel e aeração de $200 \text{ mL}_{ar} \cdot \text{g}_{meio}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

```

clear
AER = 200

% funcao obtida no ajuste dos coefientes
Z1 = sin(3.37.*(log(2.37.*AER)))
Z2 = sin(3.75.*(log(2.*AER)))
Z3 = sin(3.99.*(log(1.57.*AER)))

%Atividade Emulsificante (Valores originais)

% coeficientes ajustados através do polimônio do 2º grau
c1a = 3.228255604
c1b = -1.875064048
c2a = 0.0467246827
c2b = 0.0312151061
c3a = -0.19779707E-3
c3b = -0.15503640E-3

% vetor tempo
t = [ 0:1:144]

```

```
% matriz
```

```
y1 = c1a+c1b.*Z1 + (c2a+c2b.*Z2).*t + (c3a+c3b.*Z3).*t.^2
```

```
% matriz de entrada de AE para comparação com a AE calculada
```

```
plot(t,y1)
```