



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE ACADÊMICA**  
**COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS  
AMBIENTAIS**

**BRINDIZE FERREIRA DE LIMA**

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR AMOSTRAS DE  
*ASPERGILLUS sp* ISOLADAS DO SEMI-ÁRIDO DO  
ESTADO DE PERNAMBUCO, UTILIZANDO MEIOS  
CONTENDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

**Recife, 2014**



**BRINDIZE FERREIRA DE LIMA**

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR AMOSTRAS DE  
*ASPERGILLUS ssp* ISOLADAS DO SEMI-ÁRIDO DO  
ESTADO DE PERNAMBUCO, UTILIZANDO MEIOS  
CONTENDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

**Área de Concentração:** Desenvolvimento em Processos Ambientais.

**Linha de Pesquisa:** Biotecnologia e Meio Ambiente.

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

**Recife, 2014**

Lima, Brindize Ferreira de

Produção de Lipase por Amostras de *Aspergillus* ssp Isoladas do Semi-Árido do Estado de Pernambuco, Utilizando Meios Contendo Resíduos Agroindustriais.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

1. Produção de lipase 2. *Aspergillus* 3. Meios com resíduos agroindustriais. I. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Centro de Ciências e Tecnologia.

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR AMOSTRAS DE *ASPERGILLUS ssp* ISOLADAS  
DO SEMI-ÁRIDO DO ESTADO DE PERNAMBUCO, UTILIZANDO MEIOS  
CONTENDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

**BRINDIZE FERREIRA DE LIMA**

Examinadores:

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Carlos Alberto Alves da Silva  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Kaoru Okada  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

---

Prof. Dr<sup>o</sup> Marcos Antônio Barbosa de Lima  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Defendida em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Coordenadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarissa Dayse Costa Albuquerque

Dedico aos meus Pais, Juraci Ferreira de Lima e Djanira de Souza Lima pela dedicação e o amor incondicional e pleno. Porque toda a doutrina social que visa destruir a família é má, e para mais inaplicável. Quando se decompõe uma sociedade, o que se acha como resíduo final não é o indivíduo e sim a família.

Victor Hugo.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente ao Senhor Deus. Por ter me concebido a graça da vida e me abençoando com mais essa vitória, me dando forças nos momentos mais difíceis, acalentando meu coração nas angústias e discernimentos para continuar. Renovando minhas esperanças e contemplando meus sonhos.

A minha família, minha mãe Djanira, meu pai Juraci, meus irmãos Miriam e Rummenigge que estiveram sempre ao meu lado, como verdadeiros anjos protetores, sempre acreditando na minha capacidade de vencer cada obstáculo, me ensinando a valorizar cada momento, seja na alegria ou tristeza, demonstrando carinho e compreensão. A vocês o meu imenso amor que será eterno.

Ao Meu Amor, Marido, Companheiro Ernani Andrade, que foi como um verdadeiro incentivador dos meus sonhos esteve comigo nos momentos mais difíceis e me fez acreditar que seria possível. Vivenciou cada momento ao meu lado sempre me ajudando e me respeitando além do amor e carinho depositado a minha pessoa, hoje sou mais feliz por você existir em minha vida Te Amo.

Ao Meu Grande Orientador Prof Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, que como um anjo dedicou suas horas com imensa paciência, tranquilidade e dedicação, tornando este trabalho mais prazeroso, transformando as dificuldades em pequenas limitações, dividindo comigo as minhas inquietações e aflições. A ele todo o meu respeito e admiração, seguido de um imenso carinho.

A todos os professores das disciplinas por mim cursadas nas quais foram de grande importância para o âmbito curricular do meu conhecimento geral em toda trajetória.

A profª Drª Galba Takaki por sua imensa atenção e colaboração em nossos trabalhos realizados no laboratório, aprimorando nossos conhecimentos durante nossa caminhada.

As minhas amigas Maria Andreza, Márcia Muniz e Nadielly Andrade que como Mosqueteiras que sempre fomos ao ajudarmos umas as outras nos momentos mais difíceis, superamos todas as dificuldades e desafios, vivenciando momentos inesquecíveis de muita alegria e brincadeira. Vocês são pessoas especiais que farão sempre parte de minha história.

Aos colegas do NPCIAMB/UNICAP em especial a Marcos Luna e Grayce Kelly que foram verdadeiros amigos, sempre dispostos a ajudar nos momentos mais difíceis, meu muito obrigado a cada um de vocês pela força dedicada. Que Deus abençoe a todos!

A minha amiga Jupiranan pelo incentivo, minhas amigas Diêgena, Paloma, Claudia, meu amigo Wellington esses amigos maravilhosos que mesmo de longe demonstraram seu carinho e estavam sempre torcendo por mim. Amigos assim não tem preço. Obrigado a Todos!

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	i
<b>SUMÁRIO</b> .....	iii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>Resumo</b> .....	viii
<b>Abstract</b> .....	viii
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>1. Introdução</b> .....	2
2.1 Objetivo Geral .....	4
2.2 Objetivos Específicos .....	4
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	5
<b>3.1 BIOTECNOLOGIA</b> .....	5
<b>3.2 Enzimas</b> .....	6
<b>3.2.1 Lipases</b> .....	10
<b>3.2.2 Fermentação Submersa (FSm)</b> .....	12
<b>3.2.3. Micro-organismos Produtores de Lipases</b> .....	13
<b>3.3 Gênero <i>Aspergillus</i></b> .....	16
<b>3.3.1 Características Gerais</b> .....	16
<b>3.3.2 <i>Aspergillus sp.</i></b> .....	18
<b>3.4 CAATINGA</b> .....	19
<b>3.5 UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS</b> .....	21
<b>3.5.1 FARELO TRIGO</b> .....	22
<b>3.5.2 FARELO DE ARROZ</b> .....	23
<b>3.5.3 ÓLEOS RESIDUAIS VEGETAIS</b> .....	24
<b>4.REFERÊNCIAS</b> .....	25
<b>CAPÍTULO II</b> .....	42
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	44
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
2.1 Micro-organismos .....	45
2.2. Seleção de amostras produtoras de lipase .....	46
2.3. Pré inóculo .....	46
2.4. Seleção de meios de produção .....	46
2.5. Determinação da biomassa microbiana .....	46
2.6. Determinação do pH .....	46

2.7. Determinação da atividade lipolítica .....	47
2.8. Cálculo da atividade enzimática .....	47
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>50</b>
REFERÊNCIAS .....	50
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>53</b>
Resumo:.....	54
Abstract .....	55
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>57</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>62</b>
<b>5. REFERENCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

<b>Figura 1.</b> Mecanismos interfacial de lipase em interfaces hidrofóbicas.....	12
<b>Figura 2.</b> Imagem do gênero <i>Aspergillus</i> sp. ....	16
<b>Figura 3.</b> Morfologia representativa do gênero <i>Aspergillus</i> .....	17
<b>Figura 4.</b> Corpo de frutificação do fungo <i>Aspergillus</i> sp. Visto ao microscópio óptico. .....	18
<b>Figura 5.</b> Caatinga de Pernambuco. ....	20

### Capítulo II

<b>Figura 1.</b> Detecção de lipase: A formação de halo lipolítico, B ausência total de halo lipolítico.....	48
<b>Figura 2.</b> Determinação do pH nos meios de produção por <i>Aspergillus</i> sp SIS 10 (A) e SIS 16 (B) em 144 horas a 28°C.....	49

### Capítulo III

<b>Figura 1.</b> Resíduos agroindustriais utilizados para estudos da produção de lipase. Resíduo <b>A</b> , Farelo de trigo, Resíduo <b>B</b> , Farelo de arroz, Resíduo <b>C</b> Óleo de fritura. Utilizados para análise lipolítica da enzima. ....	57
<b>Figura 2.</b> Resíduos agroindustriais de Farelo de trigo <b>1</b> , Óleo de fritura <b>2</b> e Farelo de arroz <b>3</b> em fermentação submersa.....	58
<b>Figura 3.</b> Diagrama de pareto mostrando os efeitos principais e alterações das variáveis independentes no processo de produção de lipase por <i>Aspergillus</i> sp (SIS 16) a 144 horas de fermentação a 28°C. (1) pH, (2) NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , (3) Óleo de oliva. ....	59
<b>Figura 4.</b> Crescimento do <i>Aspergillus</i> sp (SIS 16) para o ensaio 7, em 144 horas de fermentação a 28°C e pH 5,0.....	61
<b>Figura 5.</b> Atividade Lipolítica por <i>Aspergillus</i> sp utilizando diferentes resíduos em cultivo de 192 horas à 28° C e 86 rpm. ....	61

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

<b>Tabela 1</b> – Principais classes enzimáticas. Fonte: PEREIRA, 2011.....	8
<b>Tabela 2.</b> Enzimas utilizadas em segmentos industriais e suas aplicações. ....	9
<b>Tabela 3.</b> Aplicações Biotecnológicas de Lipases. Fonte: Adaptado de Colla; Reinehr; Costa, 2012 .....	11
<b>Tabela 4.</b> Micro-organismos produtores de lipase. Fonte: WOLSKI, 2009 .....	15

### Capítulo II

<b>Tabela 1.</b> Atividade lipolítica dos isolados <i>Aspergillus sp</i> em 96 horas.....	47
<b>Tabela 2.</b> Atividade lipolítica nos meios de produção em 144 horas a 28°C por <i>Aspergillus sp</i> (SIS 10).....	48
<b>Tabela 3.</b> Atividade lipolítica nos meios de produção em 144 horas a 28°C por <i>Aspergillus sp</i> (SIS 16).....	49

### Capítulo III

<b>Tabela 1.</b> Valores dos Fatores utilizados no Planejamento Fatorial 2 <sup>3</sup> .....	58
<b>Tabela 2.</b> Produção de biomassa, pH e atividade lipolítica dos ensaios para as concentrações de pH, Óleo de Oliva e Fonte de Nitrogênio (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) em 144 horas de cultivo a 28°C a 86 rpm. ....	59
<b>Tabela 3.</b> Produção de biomassa, pH e atividade lipolítica dos ensaios em diferentes resíduos em 192 horas de cultivo a 28°C a 86 rpm. ....	61

## Resumo

As enzimas microbianas têm sido bastante produzidas e utilizadas em diversos segmentos industriais nas últimas décadas. As lipases são um grupo de enzimas que possuem uma vasta aplicação biotecnológica, devido a sua versatilidade de suas propriedades, especificidade ao substrato e atuação enzimática. Os elevados custos de produção de enzimas microbianas se devem principalmente aos meios de produção e os processos de purificação, incentivando assim as pesquisas na busca de novos micro-organismos produtores e na formulação de meios mais econômicos, utilizando principalmente formulação de resíduos agroindustriais que possuem um elevado valor nutritivo. A Caatinga é uma região ainda pouca explorada na diversidade microbiana existente e no potencial biotecnológico desses micro-organismos existentes. Foram realizadas seleções de amostras de *Aspergillus* sp denominadas de SIS 10, 11, 14, 15 e 16, isoladas da Caatinga do Estado de Pernambuco, para produção de lipase, em meio sólido, tendo as amostras SIS 10 e 16 obtidos os melhores resultados na produção dos halos característicos de 2,2 cms, respectivamente. Em seguida foram realizados ensaios de produção enzimática através de fermentação submersa utilizando 6 meios diferentes descritos na literatura como produtores de lipase. Os ensaios ocorreram à 150 rpm, 28° C, durante 144 horas, em triplicata. Os resultados obtidos revelaram que a maior produção da enzima foi obtida no meio denominado de 4 com a amostra SIS 16, obtendo uma produção de 2,16 U/mg de lipase. Após a seleção do melhor meio de produção, foram realizados ensaios para formulação de meios alternativos utilizando os seguintes resíduos agroindustriais: farelo de trigo, farelo de arroz e óleo de fritura, substituindo o óleo de oliva no meio denominado controle. Os experimentos ocorreram durante 192 horas, 28°C, 150 rpm, e os resultados obtidos indicaram o óleo de fritura como um bom produtor da enzima com atividade enzimática equivalente a 276 U/mL. Esses estudos de produção lipolítica revelam o elevado potencial biotecnológico dos fungos isolados do solo da Caatinga do Estado de Pernambuco, além da reutilização dos resíduos agroindustriais para a produção de enzimas, pode ser uma alternativa viável para formulação de novos meios de produção para biotecnologia enzimática.

**Palavras – chaves:** produção lipase, seleção meios, *Aspergillus*, resíduos agroindustriais.

## Abstract

Microbial enzymes have been extensively produced and used in various industries for decades. Lipases are a group of enzymes that have extensive biotechnological applications due to its versatility of their properties, substrate specificity and enzymatic activity. The high costs of production of microbial enzymes are mainly due to the means of production and purification processes, thereby encouraging research in search of new producer's microorganisms and to formulate the most economical medium, using mainly in formulating industrial residues that have a high nutritional value. The Caatinga is a little explored region still exists in microbial diversity and biotechnological potential of these existing microorganisms. Selections of samples of *Aspergillus* sp named SIS 10, 11,14,15 and 16, isolated from the Caatinga of Pernambuco for production of lipase in solid medium were performed, with the SIS 10 and 16 samples obtained the best results in production of the characteristic halos of 2.2 cm, respectively. Then enzyme production tests were performed through submerged fermentation using 6 different media described in the literature as lipase producers. The experiments were performance is 150 rpm, 28 °C for 144 hours in triplicate. The results showed that the highest enzyme production was obtained in the media 4 in sample SIS 16 sample, obtaining a yield of 2.16 U/mg of lipase. After selecting the best media of production, testing for formulation of alternative means were performed using the following agro-industrial residues: wheat bran, rice bran and oil in frying, substituting olive oil in the middle called control. The experiments occurred during 192 hours, 28°C, 150 rpm, and the results indicated the frying oil as a good producer of enzyme equivalent to 276 U/mL enzyme activity. These studies reveal the high lipolytic production biotechnological potential of fungi isolated from soil of Caatinga of Pernambuco State, besides the reuse of agro-industrial wastes for the production of enzymes, can be a viable alternative for the formulation of new means of production for enzyme biotechnology.

**Key - words:** lipase production, media selection, *Aspergillus*, agroindustrial residues.

# **CAPÍTULO I**

## 1. Introdução

A biotecnologia é uma ciência que envolve a maioria dos processos de transformação de matérias-primas renováveis, e de produção, mediante a presença de cultivos celulares microbianos, animais ou vegetais, ou de seus distintos componentes, em numerosas substâncias úteis para a humanidade, proporcionando a melhoria dos métodos de produção e comercialização de produtos contendo processos biotecnológicos (MAYOR, 1992; COSTA, OLIVEIRA, 2008; COSTA et al. 2012).

A tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a produção de compostos de alto valor agregado. A indústria química brasileira importa a maior parte das enzimas biocatalisadoras utilizadas nos processos que envolvem matérias auto-sustentáveis, podendo ser utilizadas e empregadas em estudos envolvendo, aplicações biomédicas e fabricação de produtos tais como, alimentícios, detergentes, farmacêutico, têxtil, celulose, papel e no tratamento de efluentes e resíduos (AZEVEDO et al., 2002; SOETAN et al., 2010; BAPTISTA et al., 2012; SILVA, 2012).

Enzimas de origem microbiana possuem diversas vantagens sobre as equivalentes de origem vegetal e animal como, menor custo de produção, além de oferecer um amplo aspecto de características físico-químicas, que vem a proporcionar uma melhor qualidade do produto, tornando mais fácil a obtenção do mesmo, desenvolvendo técnicas mais elevadas na produção de enzimas (CHERRY, FIDANTSEF, 2003; SOETAK et al., 2010; BARATTO et al., 2011; SINGH, MUKHOPADHYAY, 2012).

As lipases são carboxilesterases que hidrolisam acígliceróis de cadeia longa, e dependendo das condições empregadas, também catalisam diversas reações de síntese (esterificação, transesterificação, aminólise e lactonização). As lipases fúngicas têm sido preferenciais porque em sua maioria, não são nocivas à saúde humana. Produzidas por vegetais, animais e/ou micro-organismos, apresenta a classe mais utilizada em aplicações biotecnológica (HOUDE, KADEMI, LEBLANC, 2004; TREICHEL et al., 2010, MESSIAS et al., 2012).

Os fungos filamentosos produzem uma ampla gama de enzimas de interesse biotecnológico, dentre elas a lipase que são produzidas por fermentação. O interesse sobre a obtenção de lipases de fungos filamentosos é em razão de suas enzimas serem, na maioria das vezes, extracelulares, o que facilita a recuperação das mesmas e são bons biodegradadores, atributos que distinguem os fungos filamentosos das outras formas microbianas (BARATTO et al., 2011; MOURA et al., 2013).

Os processos de fermentação mais utilizados para a produção de enzimas são: fermentação submersa (FES) e a fermentação em estado sólido (FS) Os processos pós-fermentação, também chamados *downstream* ou a jusante da fermentação, visam recuperar as enzimas produzidas no caldo fermentado. As etapas de separação e purificação removem as substâncias tóxicas ou metabólitos indesejáveis. Na maioria dos casos, o simples enriquecimento destes compostos como fonte de nitrogênio, minerais ou vitaminas é suficiente para produção de elevada atividade enzimática (AGUIAR, MENESES, 2000; PINHEIRO, 2006; ORLANDELLI et al, 2012).

O *Aspergillus* é um gênero de fungo filamentosos que consiste de várias centenas de espécies encontrados em vários climas em todo mundo. São aeróbios encontrados em ambientes ricos em oxigênio, onde eles geralmente crescem como moldes sobre a superfície de um substrato. Este gênero é considerado cosmopolita, sua morfologia apresentam colônias com ampla variação na coloração sendo esta a maior característica macroscópica para sua classificação (GONÇALVES, ANDREATTI FILHO, 2007; GIONGO et al., 2012; MONTEIRO, 2012).

A imensa diversidade de micro-organismos existentes em regiões pouco estudadas como a caatinga do Estado de Pernambuco, justifica a busca por novos produtos tecnológicos como as enzimas. O clima semiárido submete sua biota às condições climáticas extremas, A diversidade fungica em ecossistemas áridos e semiáridos como o da caatinga pode ser igual ou superior quando comparada a de ambientes úmidos. Isso se deve ao baixo potencial hídrico do solo, inapropriado ao crescimento de bactérias, o que torna a cadeia alimentar em sistemas áridos baseada primariamente nos fungos. (CRUZ, GUSMÃO 2009; BOTTCHEER, BONSCHERUER, 2010; IPA, 2012).

A utilização de substratos formulados a partir de resíduos agroindustriais surge como uma alternativa de buscar novos produtos de interesse biotecnológico para o ramo industrial (MATOS, 2005; SANTOS, 2008; PEREIRA et al, 2013). A utilização desses substratos alternativos e de baixo custo na maioria das vezes encontra-se em grandes quantidades e possui um elevado valor nutricional. O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola é um dos que mais produzem resíduos agroindustriais, e vem buscando alternativas para a aplicação dos mesmos para fins industriais (SALIHU, 2012; INFANTE et al.,2013).

O presente trabalho teve como objetivo a utilização de resíduos agroindustriais (Farelo de trigo, Farelo de arroz e Óleo de fritura para elaboração de meios de produção de lipase via catálise enzimática, utilizando *Aspergillus sp* (SIS 16) com a utilização de um planejamento fatorial, visando especialmente o menor custo de produção bem como a minimização dos impactos ambientais.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Produzir por *Aspergillus ssp* e caracterizar lipase , através da seleção de meios de produção e da formulação alternativa de meios de produção contendo substratos agroindustriais.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar isolados de *Aspergillus ssp*, produtores de lipase oriundos do solo da caatinga de Pernambuco;
- Avaliar e selecionar os meios tradicionais para a produção de lipase associados à cinética de produção;
- Analisar a utilização de diferentes substratos (farelo de trigo, farelo de arroz, óleo de fritura) na produção de lipase através de um planejamento fatorial  $2^3$ ;
- Analisar a influência das variáveis, temperatura, pH e velocidade de agitação na produção de lipase.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 BIOTECNOLOGIA**

A biotecnologia pode ser definida como um conjunto de técnicas de manipulação de seres vivos ou parte destes, para fins econômicos. Esse amplo conceito inclui técnicas que são utilizadas em grande escala na agricultura desde o início do século XX, como a cultura de tecidos, a fixação biológica de nitrogênio e o controle biológico de pragas. O desenvolvimento da biotecnologia, desde o início dos anos 90, vem fornecendo soluções para o baixo dinamismo das trajetórias tecnológicas de muitas indústrias nas áreas de saúde, meio ambiente e agricultura (OLIVEIRA, 2011; SILVEIRA et al., 2011; SANTOS 2012).

A utilização de plantas, bactérias e fungos pode ser visto na biotecnologia primitiva, desenvolvida no antigo Egito há mais de 10.000 anos, na fermentação de bebidas que chegaram aos nossos dias (GARRIDO, 2007; FÁRI, KRALOVÁNSZKY, 2006; PESSOA et al., 2012). Desde a revolução industrial, os avanços envolvendo ciência e tecnologia vem contribuindo para gerar níveis diferenciados de desenvolvimento entre as nações, e assegurar níveis mais elevados no desenvolvimento científico e tecnológico (WAACK; AMOROSO, 2005; CARDINALI et al., 2012).

As abordagens mais modernas de biotecnologia estão fundamentadas na inclusão de novas descobertas, na descrição e no potencial de utilização dos seres vivos, e como estes se relacionam com o meio ambiente, ocorre à expressão de seu metabolismo, na formação de substâncias químicas com diferentes pesos moleculares que atuam em diferentes níveis (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; ALENCAR, 2011).

Os avanços biotecnológicos na produção industrial das enzimas, por exemplo, vêm proporcionando sua aplicação nos diferentes segmentos industriais e biotecnológicos. A biotecnologia é vista como sendo uma forte e confiável tecnologia, relativamente de baixo risco, capaz de ser implementada em larga escala e em grande variedade de setores industriais (PADILHA et al 2011; BERLINCK, 2012).

### 3.2 Enzimas

A origem da palavra enzima, remota ao termo grego *énzymo* (*én* = *no*; *zymos* = *levedura*) que surgiu a princípio como nome genético para “fermentos” que atuavam na ausência de organismos, sugerido para o primeiro trabalho do fisiologista alemão Wilhelm Friedrich Kuhne (1837-1900). Anos depois foi sugerido que a denominação se estendesse para todos os “fermentos” não organizados (NELSON, COX, 2002; FAHEINA JUNIOR, 2012).

Catalisadores biológicos de natureza essencialmente proteica participam em várias reações bioquímicas, tendo como papel fundamental o controle metabólico. Estas moléculas aceleram reações termodinamicamente viáveis, sendo extremamente versáteis, estereoespecíficas, e de elevada importância nos processos biotecnológicos. Normalmente os processos enzimáticos têm ação rápida, não apresentam toxicidade nem geram problemas ambientais, ocorrem em condições brandas de temperatura e pH, atuando sobre um substrato específico (DHIMAN, SHARMA, BATTAN, 2008; RIBEIRO et al., 2013).

As enzimas não apresentam perigo para o meio ambiente, porque são moléculas orgânicas constituídas de grupos de aminoácidos presentes em todos os seres vivos. São providas de substâncias orgânicas de natureza proteica com atividade intra e extracelular que possuem funções catalisadoras. A ampla diversidade quanto às características das enzimas potencializa sua aplicação assim há um estímulo natural pela exportação da biodiversidade microbiana (DAMASO, 2008; SOUZA, 2012).

Apresentam uma configuração globular, constituídas de estruturas terciárias ou quaternárias, cuja função principal é atuar como catalisador biológico, acelerando a velocidade de diversas reações químicas existentes no organismo, sem, contudo serem modificadas durante o processo, pois possuem elevada especificidade e estão associadas a todos os eventos metabólicos (SOUZA; RABELLO; ASCHERI, 2012).

São biocatalisadoras e com propriedades que as tornam altamente requisitadas, são muito ativas e versáteis, realizando uma série de transformações de modo seletivo e rápido. A grande vantagem é que elas catalisam as transformações moleculares sem a ocorrência de reações paralelas, o que é comum em sínteses químicas devido sua especificidade (PATEL, 2002; PEZARRO, PARK, 2003; MOURA et al., 2013).

As especificidades inerentes das enzimas residem em uma cavidade ou fenda de ligação do substrato, que pode está situada na superfície da proteína enzimática. A cavidade, denominada de sítio ativo, é um arranjo de grupos presentes em cadeias laterais de certos aminoácidos que ligam os substratos através de ligações covalentes. Muitas vezes, os resíduos de aminoácidos que formam o sítio ativo se localizam em regiões distantes, na sequência primária e/ou mais próximas pelo enovelamento da cadeia polipeptídica (TOSTES, 2006; OLIVEIRA 2007; FREITAS, 2013).

A utilização de enzimas como catalisadores em processos industriais, mostra-se vantajoso, pois são consideradas específicas naturais e geralmente não apresentam elevada toxicidade, características desejáveis nos setores industriais e ambientais (FERNANDES, 2006; FEITOSA, 2009; TAVARES et al., 2012). Novas enzimas e diversas utilidades estão sendo descobertas a partir de trabalhos conjuntos de equipes multidisciplinares da Microbiologia, Bioquímica, Química, Engenharia Bioquímica, entre outras áreas, complementando os conhecimentos que cada área possui sobre as enzimas (SOUZA, 2001; CUZZI et al., 2011; ORLANDELLI et al., 2012).

O setor de produção de enzimas apresenta muitas iniciativas de pesquisa e desenvolvimento, que resultando na produção de diversos novos produtos e no aprimoramento de processos e melhor desempenho de produtos já existentes no mercado. No entanto, o custo elevado de produção e purificação de enzima é um dos principais fatores que determinam a economia de um processo. Reduzir os custos de produção é fundamental para aplicações industriais (PARK et., al. 2002; SANTOS et, al. 2013).

A produção de enzimas microbianas tem sido um campo crescente da biotecnologia. Todas estas enzimas produzidas industrialmente apresentam um elevado papel, para o potencial tecnologico de processos industriais tais como o biobranqueamento de pasta de papel, a degradação e desintoxicação de substâncias recalcitrantes ou na indústria alimentar. Assim, a produção eficiente destas enzimas em um meio de baixo custo apresenta inúmeras aplicações biotecnológicas. Não se sabe precisamente quando as enzimas passaram a ser utilizadas nas atividades cotidianas das sociedades primitivas. Entretanto, as enzimas já eram amplamente utilizadas sem que se conhecesse seu conceito e função exata (ZIMMER et al., 2009; LEVIN et al., 2012).

O custo de produção das enzimas microbianas de uma maneira geral é bem menor dos utilizados para produção de enzimas vegetais e animais. O tempo de produção é muito mais curto para sua obtenção, permitindo assim a utilização de diversos substratos mais baratos na formulação dos meios de manutenção e produção e conseqüentemente de um maior rendimento na produção devido à otimização das condições utilizadas nos processos fermentativos (SAID, PIETRO, 2002; HAKI, RAKSHIT, 2003; TAVARES et al., 2011).

Dessa forma, as enzimas são classificadas em seis grupos de acordo com o tipo de reação que é catalisada: Oxiredutases, Transferases, Hidrolases, Liases, Isomerases e Ligases (GUIMARÃES et al., 2010; TAVARES et al., 2012; BISATTO, 2012). A tabela 1 descreve as reações catalisadoras pelas enzimas.

**Tabela 1** – Principais classes enzimáticas. Fonte: PEREIRA, 2011

Classe da enzima	Tipo de reação catalisada
Oxiredutases	Catalisam reações de oxirredução. Transferência de H,O ou elétrons.
Transferases	Catalisam transferências de grupos entre moléculas.
Hidrolases	Catalisam reações de hidrolises.
Liases	Catalisam a adição de grupos a ligações duplas e vice-versa.
Isomerases	Catalisam reações isomerização.
Ligases	Catalisa a união de duas moléculas, associadas à ruptura da ligação tirofosfato do ATP.

No entanto, o custo de produção dessas enzimas é o principal fator que determinam a economia de um processo o que limita sua aplicação em grande escala. Na Tabela 2 estão listadas as enzimas e suas respectivas aplicações (SOCCOL et al, 2010; SANTOS et al, 2012). A tabela 2 descreve as aplicações industriais das enzimas.

**Tabela 2.** Enzimas utilizadas em segmentos industriais e suas aplicações.

Fonte: KIRK, BORCHERT E FUGLSANG, 2002 in WEINGARTNER, 2010.

Setor industrial	Classe da enzima	Aplicação
Detergente (lavanderia e louças)	Protease Amilase Lipase Celulase Mananase	Remoção de manchas protéicas Remoção de manchas amiláceas Remoção de manchas lipídicas Limpeza, clareamento da cor, anti-redeposição (algodão) Remoção de manchas de mananas (reaparecimento de manchas)
Alimentos (incluindo laticínios)	Protease Lipase Lactase Pectina metil esterase Pectinase Transglutaminase	Coagulação do leite, fórmulas infantis (pouco alergênico), sabor Sabor queijo Remoção de lactose (leite) Firmar produtos à base de frutas Produtos à base de frutas Modificar propriedades visco-elásticas
Panificação	Amilase Xilanase Lipase Fosfolipase Glicose oxidase Lipoxigenase Protease Transglutaminase	Maciez e volume do pão, ajuste de farinha Condicionamento de massa Estabilidade e condicionamento de massa (emulsificante <i>in situ</i> ) Estabilidade e condicionamento de massa (emulsificante <i>in situ</i> ) Fortalecimento da massa Reforço da massa, branqueamento de pão Bolachas, biscoitos Massa forte laminada
Bebidas	Pectinase Amilase $\beta$ -Glucanase Acetolactato descarboxilase Lacase	Despectinização, trituramento Tratamento de suco, cerveja de baixa caloria Trituramento Maturação (cerveja) Clarificação (suco), sabor (cerveja), tratamento da rolha de cortiça
Têxtil	Celulase Amilase Pectato liase Catalase Lacase Peroxidase	Acabamento Denim, suavização do algodão Desengomagem Expurgo Branqueamento terminal Branqueamento Remoção do excesso de corante
Papel e celulose	Lipase Protease Amilase Xilanase Celulase	Controle de piches, controle de contaminantes Remoção de biofilme Melhoria dos processos de engomagem, descoloração, drenagem Incremento da ação alvejante Melhoria dos processos de descoloração, drenagem, alteração da fibra
Gorduras e óleos	Lipase Fosfolipase	Trans-esterificação Desengomagem, produção de liso-lecitina

### 3.2.1 Lipases

As lipases (E. C. 3.1.1.3) são enzimas capazes de clivar a ligação éster de triacilgliceróis, e em condições favoráveis realizam uma série de reações de síntese, como as de esterificação e transesterificação. As lipases microbianas são as mais comumente usadas, pois possuem elevadas características para seu emprego em meios orgânicos (JAERGER, REETZ, 1998; SHARMA, CHISTI, BANERJEEA, 2001; OLIVEIRA et al., 2013). São classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases. Escolhendo a lipase adequada é possível controlar quais produtos são gerados e minimizar as reações secundárias devido a sua especificidade (VECCHIA, NACIMENTO, SOLDI, 2004; HASAN, F et al., 2006; MULLER, 2013).

Lipases microbianas constituem um dos grupos de enzimas que possuem uma imensa variedade de aplicações biotecnológicas, principalmente pela versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, e pela facilidade de produção em massa, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (PAQUES; MACEDO, 2006; FEITOSA et al., 2010; FACCHIN et al., 2013). Atuam na interface entre o substrato e uma fase aquosa, em que a enzima é dissolvida.

Enzimas hidrolíticas, como as lipases, possuem elevadas aplicações promissoras no tratamento de efluentes de indústrias de fabricação de doces, sorvetes, laticínios, carne de indústrias, na produção de fármacos, emulsificantes, alimentos, perfumaria, produção de couros, produção de aromas e fragrâncias, modificações de lipídeos para biodiesel e lipídeos estruturados e no pré- tratamento de efluentes com elevado teor de lipídeos gerados pela indústria de alimentos (MACEDO et al., 2009; MENDES, ALBERTON et al., 2010; CASTRO, GIORDANO, 2013).

A literatura descreve que isso acontece por atributos como alta conversão de substrato em produtos, facilidade de manipulação genética, rápido crescimento do micro-organismo produtor, e utilização de meios de cultivos baratos. O que torna as lipases microbianas ainda mais interessantes para aplicações industriais (HORCHANI et al., 2009; ABREU, 2013). Tendo em vista a extensa diversidade das lipases microbianas e a reduzida fração de identificação de micro-organismos encontrados na natureza, a busca por novas espécies lipolíticas vem sendo cada vez mais intensificada.

Várias espécies de bactérias e fungos filamentosos são utilizados por secretarem lipases durante o crescimento em hidrófobos reciclados, substratos de baixo custo, são importantes fontes de aplicações industriais. As lipases são geralmente produzidas e excretadas por fermentação submersa ou fermentação em estado sólido (GOMES et al., 2006; NAQVI et al., 2013).

A produção de enzimas lipolíticas microbianas é influenciada por fatores nutricionais e físico-químicos. Fatores nutricionais como fontes de carbono e nitrogênio, fontes de lipídeos e óleos vegetais (oliva, soja, milho, azeitona e girassol). São utilizados como fontes de carbono para melhorar a produção da enzima. As substâncias não gordurosas não são utilizadas como fontes de carbono, a presença de lipídios no meio de cultura pode influenciar a atividade enzimática. Porém para obter uma alta produtividade na atividade lipolítica é necessário estudar cada fonte para encontrar as condições adequadas de elaboração dos meios de produção (FEITOSA, 2010; TOSCANO et al., 2011; SALIHU et al., 2012; USCÁTEGUI et al., 2012).

Apesar da ampla gama de aplicação das lipases, seu uso, assim como de qualquer biocatalisador, é dificultado por estarem sujeitos à perda de atividade em diferentes condições físicas, químicas e biológicas (CRUZ, 2007; PACHECO, 2012). Na tabela 3 estão descritas algumas das aplicações industriais das lipases.

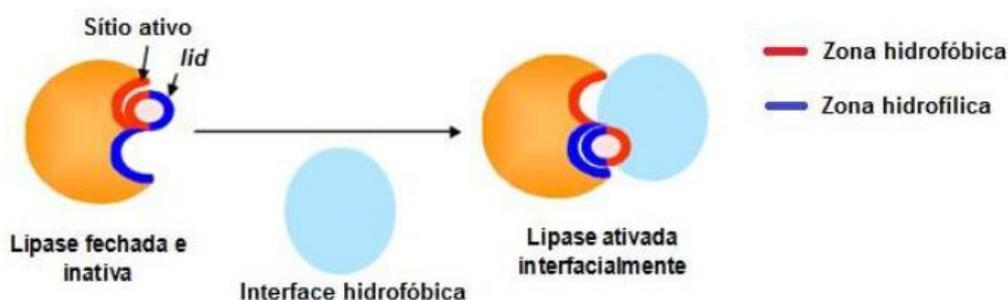
**Tabela 3.** Aplicações Biotecnológicas de Lipases. Fonte: Adaptado de Colla; Reinehr; Costa, 2012.

<b>Indústria</b>	<b>Ação</b>	<b>Produto c/ou Aplicação</b>
Detergentes	Hidrólise de Gorduras	Remoção de óleos
Derivados de Laticínios	Hidrólise de gordura do leite, maturação de queijos, modificação de manteiga.	Desenvolvimento de agentes flavorizantes em leite, queijos e manteiga.
Bebidas	Aromas	Bebidas
Gorduras e Óleos	Transesterificação, hidrólise	Manteiga de cacau, margarinas, ácido graxos, glicerol, mono, diglicerídios.
Farmacêutica	Transesterificação, hidrólise	Lipídeos específicos, digestivos
Cosméticos	Síntese	Emulsificantes,
Papel	Hidrólise	Melhoria da qualidade do papel
Limpeza	Hidrólise	Remoção de gorduras
Couro	Hidrólise	Produtos de couro

Nas lipases, o sítio ativo fica localizado dentro de uma cavidade hidrofóbica que pode ser superficial ou profunda, de acordo com a homologia a que pertencem. Nesta cavidade se aloja o ácido graxo de modo a posicionar a ligação éster alinhada com o sítio ativo. Esta cavidade é geralmente protegida por uma “cadeia” polipeptídica que se abre, expondo o sítio ativo, quando a lipase se encontra na interface polar/apolar. Isto explica porque a grande maioria das lipases tem sua atividade aumentada sobre substratos insolúveis em água na interface óleo/água (SHARMA, CHISTI, BANERJEEA, 2001; RIGO, 2009; OLIVEIRA et al., 2013).

A estrutura da enzima e forma do sítio ativo podem ser afetadas por qualquer agente capaz de provocar mudanças conformacionais na estrutura proteica, provocando assim alterações na forma do sítio ativo. Fatores que exercem influências desse tipo na estrutura enzimática contribuem para a diminuição de sua capacidade catalítica podendo ainda levar à inativação da enzima (GAUR, GUPTA, KHARE, 2008; CAPUTO 2012). A figura 1 mostra mecanismos interfaciais de lipases em interfaces hidrofóbicas.

**Figura 1.** Mecanismos interfacial de lipase em interfaces hidrofóbicas.



Fonte: RODRIGUES, 2009.

### 3.2.2 Fermentação Submersa (FSm)

Os processos submersos são aqueles em que o micro-organismo, ou mesmo outras células, desenvolvem-se em meio de cultura com excesso de água sob agitação. As fermentações são conduzidas em biorreatores agitados mecanicamente, com volumes que podem chegar a 1000 m<sup>3</sup>. (KIRK, BORCHERT, FUGLSANG, 2002; CASTRO, PEREIRA JUNIOR, 2010; FAHEINA JUNIOR, 2012). O termo

fermentação, diferentemente de sua definição bioquímica, é utilizado na área de engenharia em processos tanto aeróbio como anaeróbios (HÖLKER, HÖFER, LENZ, 2004; CAMELINI, 2010).

A fermentação submersa é tradicionalmente utilizada para produção de enzima, pois há melhor controle de alguns parâmetros importantes do processo como pH e crescimento celular, além de ser facilitada a recuperação de enzimas extracelulares e a determinação da biomassa. É principalmente utilizada em fermentações bacterianas (FERNANDES, 2006; OLIVEIRA; WATANABE; RODRIGUES, 2011).

Este processo é o mais empregado para a produção de enzimas lipolíticas devido à facilidade dos micro-organismos crescerem em condições controladas de pH e temperatura. A produção de enzimas lipolíticas pode ser realizada em diferentes sistemas, como em escala laboratorial em frascos agitados e agitadores de bancada, como em escala industrial, ou fermentações industriais (ELLIAH et al., 2004; KANWAR et al., 2002; MAHADIK, 2004; FEITOSA, 2009).

A fermentação submersa tem aplicações industriais, na área de alimentos e farmacêutica para obtenção de agentes flavorizantes, polissacarídeos, vitaminas, enzimas, ácidos orgânicos e antibióticos. Na FSm de micro-organismos os principais fatores que afetam o processo são a disponibilidade de carbono, tais como açúcares e outros carboidratos, fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio, íons inorgânicos como fosfato, magnésio, ferro, cobre, manganês e zinco que são necessários para o crescimento.

### **3.2.3 Micro-organismos Produtores de Lipases**

A literatura descreve que diversos fungos filamentosos isolados de solo são considerados produtores de lipase e vêm sendo utilizado em técnicas de culturas de enriquecimento. Uma revisão recente tem proporcionado uma visão abrangente das fontes, isolamento, purificação e aplicações de lipases fúngicas. A habilidade de degradação de compostos por micro-organismos é consequência da evolução dos sistemas enzimáticos de células procariotas e eucariotas, coexistindo com uma enorme variedade de substâncias naturais de diferentes origens. Esta diversidade de substratos potenciais ao crescimento resultou, então, no aparecimento de enzimas aptas a transformar moléculas orgânicas com estruturas bastante distintas (BOUWER; ZEHNDER, 1993; LINK, ONOFRE, 2010; NAGARAJAN, 2012).

Estes microrganismos estão presentes em todos os ambientes e são economicamente importantes no campo da medicina, da fitopatologia e da indústria, além de serem ecologicamente importantes como decompositores (VECCHIA, FONTES, 2007). Os fungos filamentosos se destacam devido à sua facilidade de cultivo, por secretarem suas enzimas diretamente no meio em que se encontram, não necessitando de ruptura celular para sua liberação. Adicionalmente, apresentam elevados níveis de produção enzimática, com grande potencial para diversas aplicações industriais (POLIZELI et al., 2005, GUIMARÃES et al., 2006; STROPARO, 2012).

Nos micro-organismos, as lipases podem apresentar atividade fosfolipídica, sendo utilizadas como mecanismo de defesa, ácidos graxos livres são liberados e auxiliam na adesão tecidual célula-célula e célula-hospedeira (SAXENA et al., 2003; JAEGER, KOLMAR, 2005; MESSIAS et al., 2011). processos biotecnológicos industriais e ambientais tem sido uma das alternativas mais viáveis empregadas nos últimos anos, devido as suas inúmeras vantagens apresentadas como: a elevada capacidade fisiológica de reprodução e produção de diversas substâncias em diferentes temperaturas, pHs e meios de cultivo (CETEM, 2011; SILVA et al., 2012).

O uso de micro-organismos como fonte biotecnológica de enzimas relevantes para processos alimentícios tem estimulado o interesse na exploração da atividade enzimática extracelular. Dentro deste contexto, os fungos desempenham importante papel no processo de bioconservação, pois podem reduzir a quantidade de resíduos, minimizarem a poluição, formar produtos de interesse às indústrias de alimentos, papel, fármacos, entre outros (RAJENDRAN, PALANISAMY, THANGAVELU, 2009; CRUZ, 2012).

Os fungos filamentosos são reconhecidos como fontes de lipases extracelulares, facilitando a recuperação da enzima a partir do caldo de cultura. Assim, a produção de lipase depende largamente de micro-organismos, práticas de cultura (fermentações líquidos ou sólidos), composição do meio e biorreator. Os micro-organismos secretam lipase durante o crescimento em resíduos orgânicos e agro-industriais que são como fonte significativa de nutrientes que podem servir como meios de crescimento na produção de lipase. No entanto, a disponibilidade de lipases possuindo características adequadas para uma aplicação específica ainda é um fator limitante (ALONSO et al, 2005, SALIHU et al, 2012).

A literatura reporta que uma variedade de micro-organismos é capaz de produzir enzimas, através da fermentação, em condições experimentais definidas. Entretanto, a quantidade de enzima produzida, na maioria dos casos somado ao custo associado ao meio de cultivo inviabiliza a transposição do processo para escala industrial. Dessa forma, a identificação de micro-organismos que produzam quantidades de enzimas, bem como a busca por meios de cultivo de baixo custo, torna-se

oportuna para aperfeiçoar a produção industrial de enzimas de interesse biotecnológico gerando economia no processo produtivo (OLIVEIRA et al, 2007, JESUS et al, 2013).

A produção de lipase extracelular microbiana depende das condições de cultivo como a quantidade de nitrogênio e carbono disponíveis, a presença de sais inorgânicos que pode estimular ou inibir a produção da enzima, ou a disponibilidade de oxigênio dissolvido e o arejamento. Os fatores ambientais como o pH e temperatura também são importantes para a produção. Fungos filamentosos podem ser produtores de enzimas de importância biotecnológica e enzimas produzidas por esses micro-organismos apresentam características importantes para a aplicação em bioprocessos (SILVA, 2012; RESENDE et al, 2013).

De forma geral, as lipases podem ser extraídas de diferentes fontes, microrganismos, animais e vegetais. As produzidas por fontes microbianas são as mais utilizadas, que são mais comuns na natureza e podem ser isolados de diversos habitats, sendo especialmente valorizadas por serem extracelulares o que facilita sua recuperação do meio de cultivo (MAHADIK et al., 2002; CARVALHO et al., 2003; COLLA, REINEHR; COSTA, 2012).

os micro-organismos mais descritos como bons produtores de lipases são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Fusarium*. *Mucor* e leveduras do gênero *Yarrowia lipolytica* e bactérias como *Bacillus*. Micro-organismos de uma mesma linhagem possuem o potencial de produzir enzimas com características completamente ou parcialmente diferenciadas, e por este motivo a busca por novas fontes microbianas continua sendo foco de vários pesquisadores (BARBOSA, 2011). A Tabela 4 descreve gêneros de micro-organismos produtores de lipase.

**Tabela 4.** Micro-organismos produtores de lipase. Fonte: WOLSKI, 2009

Micro-organismo	Atividade lipolítica	Autor/Referência
<i>Aspergillus niger</i>	4,29 U/mL	ELLALIAH et al (2004)
<i>Ralstonia pickettii</i>	8,5 U/mL	HEMACHANDER et al (2001)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	2,4 U/mL	SZATAFER et al (1992)
<i>Candida rugosa</i>	14,9 U/mL	BENJAMIN E PANDEY (1997)
<i>Aspergillus niger</i>	4,1 U/mL	MAHADIK et al (2004)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	3,15 U/mL	YANG et al (2005)
<i>Penicillium verrucosum</i>	3,15 U/mL	KEMPKA et al (2008)

### 3.3 Gênero *Aspergillus*

#### 3.3.1 Características Gerais

O gênero *Aspergillus*, consiste de fungos filamentosos, espécies descritas como anamorfos (reprodução assexuada) e de dispersão cosmopolita, podendo ser encontrados principalmente em material vegetal em decomposição. Atualmente são conhecidas aproximadamente 250 espécies, demonstrando a grande diversidade e variabilidade encontradas no gênero. Pertencentes ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem dos Eurotiales, família Trichocomaceae e gênero *Aspergillus*. Pertencem também ao grupo dos hyalhyphomyces, os quais formam esporos. É considerado “tropical”, devido ao fato de ser muito encontrado em países desta natureza e que possuem uma grande variação de temperatura (RITTER, 2007; MARTINS 2012).

Suas colônias podem apresentar coloração branca, rosada, amarela, amarelo-esverdeada, amarronzada ou verde. Entre as espécies mais conhecidas, encontram-se o *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus*, *A. versicolor*, *A. sojae*, *A. awamori*, *A. usamiy*, *A. kawachii*. É um dos gêneros mais utilizados na indústria da biotecnologia por seus elevados níveis de secreção de proteína para a produção de enzimas microbianas na utilização alimentar. Algumas espécies são usadas tradicionalmente no norte da África, na fermentação de grãos para a produção de alimentos e bebidas (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005; SOARES et al., 2010; VITA, 2013).

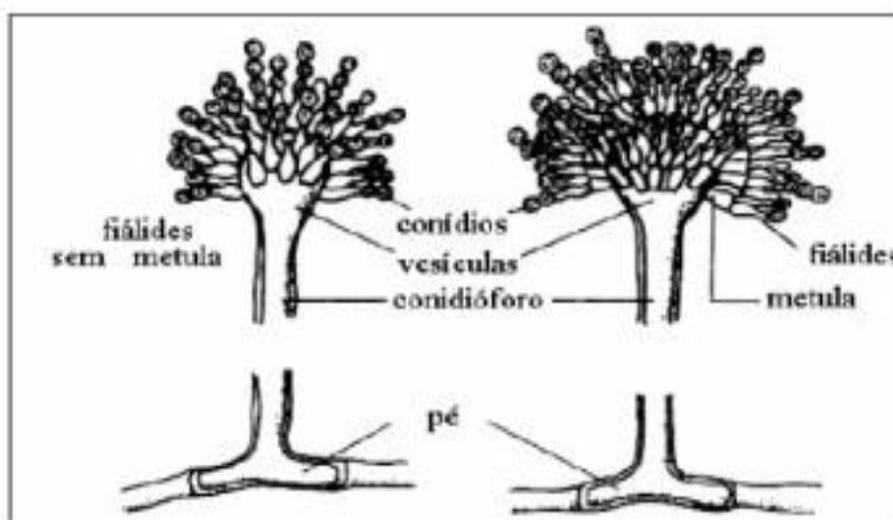
**Figura 2.** Imagem do gênero *Aspergillus* sp.



Fonte adaptado: LACAZ et al., 2008.

Consequentemente são os mais estudados devido a sua elevada capacidade de fermentação e altos níveis de produção enzimática, principalmente aquelas utilizadas na hidrólise de polissacarídeos da parede celular das plantas e na indústria de alimentos. Em particular, tem sido utilizado com muito sucesso para a produção de proteínas recombinantes, tanto de origem fúngica como de outras fontes, e podem ser cultivados em larga escala em fermentadores industriais. Entre os fungos microscópicos esse gênero é conhecido por sua ubiquidade e caracterizado pela formação abundante de esporos. (LOPES, 2011; GOTTSCHALK et al., 2013). Encontrados em solos de clima temperado, contêm um gene que codifica uma ação positiva e regula a transcrição de aflatoxinas. (SUBHASH, MOHAN, 2011; OLIVEIRA, 2013).

**Figura 3.** Morfologia representativa do gênero *Aspergillus*



Fonte Adaptado: ROCHA, 2010.

Estudos realizados por SANTOS, LINARDI, 2004; SILVA, RONDON, 2013 utilizaram fungos dos gêneros *Aspergillus*, para biodegradação de compostos fenólicos, pois são capazes de degradar compostos aromáticos em seu metabolismo por meio de enzimas catabólicas celulases, lacases, proteases e fenol-hidroxilases.

Cerca de 50 novas espécies de *Aspergillus* foram descritas desde 2000, com base em característica morfológica e molecular, sendo muitos deles morfológicamente indistinguíveis. Os critérios morfológicos utilizados para a classificação da espécie do gênero *Aspergillus* baseiam-se na utilização de meios de culturas e diferenciais que temperaturas de incubação no desenvolvimento de características que podem ser úteis para a sua identificação RODRÍGUEZ, 2007; ALVARENGA et al, 2012).

### 3.3.2 *Aspergillus sp*

Reproduzem-se por meio de ciclos assexuados; nessa última forma, as hifas originam ramificações denominadas conidióforos, local de armazenamento e desenvolvimento de esporos. O conhecimento da forma e tamanho dessas estruturas reveste-se de grande importância em microbiologia, visto que a observação dessas características, peculiares a cada gênero ou espécie, proporcionará facilidades no processo de identificação dos fungos. Esta espécie apresenta-se como um bom produtor de lipase extracelular por ter capacidade de fermentar uma grande variedade de matérias primas (ANDREATTI FILHO, 2007; SBARDELOTTO et al., 2013.)

Alguns dos fungos produtores de lipase comercialmente mais importantes são reconhecidos como pertencentes ao gênero *Aspergillus sp*. A produção de lipase por fungos filamentosos varia de acordo com a composição do meio, condições de cultura, o pH, temperatura, e o tipo de fontes de carbono e nitrogênio (MACIEL, 2006; WEINGARTNER, 2010 TREICHEL et al, 2010).

Os gêneros de fungos filamentosos são considerados importantes agentes decompositores de materiais lignocelulolíticos e encontrados em abundância nos solos. Estes grupos de microorganismos não representam um grupo predominante no solo, e sua ocorrência está condicionada a fatores como pH, umidade e quantidade de matéria orgânica (ZILLI, 2003; BARROS, 2012).

**Figura 4.** Corpo de frutificação do fungo *Aspergillus sp*. Visto ao microscópio óptico.



Fonte: Adaptado BARROS, 2012.

### 3.4 CAATINGA

A caatinga é a vegetação predominante na região Nordeste, cobrindo 54,53% dos 1.548.672Km<sup>2</sup> de área. Envolvendo áreas dos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, sudoeste do Piauí e partes do interior da Bahia e do Norte de Minas Gerais. Esse bioma possui características restritas e peculiares que vêm confirmar sua exclusividade de ocorrência no território brasileiro (ANDRADE et al., 2007; RODAL, COSTA, SILVA, 2008; MARANGON et al., 2013).

Mesmo com a existência de vários estudos, parece consensual a falta de uma definição clara de “Caatinga”, que seja oficialmente aceita e reconhecida pela maioria dos estudiosos do tema. A precipitação anual varia de 150mm a 1300mm e média de 700mm. A temperatura média está em torno de 28C, com mínima de 8 e máxima ao redor de 40°C, e umidade relativa do ar em torno de 60%. Os solos predominantes da região são classificados como latossolos, litólicos, podzólicos, brunos não cálcicos, areias quartzosas e os planossolos solódicos. Quimicamente, podem ser adequados, mas, normalmente apresentam restrições físicas, drenagem irregular, acidez e pouca vocação agrícola (ARAUJO FILHO et al., 2002; PEREIRA FILHO et al, 2013).

O solo armazena organismos vivos e proporciona altas taxas metabólicas que ocorrem em seu interior, por existirem raízes e decomposição da matéria orgânica. É nesta região, a da rizosfera, onde existe maior atividade microbiana, em razão da presença de exsudatos e secreções radiculares, que representam a maior parte do carbono disponível para os micro-organismos. Sem a influência das raízes e da atividade da biota que funcionam de forma simbiótica, o solo pode ser considerado oligotróficos ou relativamente pobre em fontes de carbono disponíveis (ARAÚJO, MONTEIRO, 2007; BARROS, 2012).

A reciclagem de nutrientes acumulados na superfície do solo desempenha um importante papel para obtenção de micro-organismos como, por exemplo, os fungos conidiais, que são ótimos decompositores deste ambiente. Apesar das condições extremas, estudos comprovam que a caatinga é rica em espécies de animais e vegetais, embora apresente condições de solo bastante alterado pela perturbação e degradação ambiental causada pelo uso irracional dos recursos naturais o que tem levado à rápida perda de espécies e de processos ecológicos importantes para a manutenção dos seus

ecossistemas (GIONGO et al., 2012; MELLO et al., 2012).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística é o Bioma mais representativo do Semiárido Tropical Brasileiro, sendo considerado um bioma completamente Brasileiro possui um dos tipos vegetacionais brasileiros mais complexos, cujas características principais são florestas arbóreas ou arbustivas, compreendendo principalmente árvores e arbustos baixos muitos dos quais apresentam espinhos, microfilia e características xerofíticas (figura 4). Obtendo-se assim uma enorme biodiversidade de micro-organismos, os fungos, por exemplo, têm um importante papel na ciclagem dos nutrientes acumulados na superfície do solo. (IBGE, 2010; GIONGO et al., 2012). A figura ilustra o bioma da caatinga de Pernambuco.

**Figura 5.** Caatinga de Pernambuco.



Fonte: CORREIA 1996.

A imensa diversidade de micro-organismos existentes em regiões pouco estudadas como a caatinga do Estado de Pernambuco, justifica a busca por novos produtores de enzimas. O clima semi-árido submete sua biota a condições climáticas extremas, parte do conjunto de ecossistemas de latitudes tropicais e subtropicais, a vegetação predominante da caatinga torna a cadeia alimentar de sistemas áridos baseada primariamente nos fungos (CRUZ; GUSMÃO, 2009, BOTTCHER; BONSCHERUER, 2010; IPA, 2012).

### 3.5 UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

A redução nos custos de produção tem sido uma das formas de ampliar o uso de enzimas em diversos segmentos industriais. A otimização da fermentação e do processo de produção, têm sido alvo de extensas pesquisas e, nesse sentido, a utilização de resíduos agroindustriais como substratos alternativos em processos fermentativos vem sendo estudado por diversos pesquisadores (SOCCOL, VANDENBERGHE, 2003; OLIVEIRA et al., 2007; SILVA et al, 2012).

O aumento da conscientização ecológica, iniciado no final do Século XX, deixou claro que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a igualdade social e a sustentabilidade ambiental. Consequentemente o desenvolvimento de tecnologias limpas visando à produção de compostos orgânicos com aplicações industriais, a partir de recursos renováveis deve se tornar a nova matriz da produção industrial como é o caso da biomassa vegetal (BOTELLA et al., 2007; SANTOS et al., 2012).

A grande expansão agroindustrial, paralela à utilização dos recursos ambientais tem mobilizado vários segmentos da sociedade para a correta gestão ambiental destes, e assim tem-se aplicado políticas ambientais, a fim de diminuir impactos negativos a natureza. O termo resíduo, geralmente, é associado a lixo, porém, sabe-se hoje que os resíduos sólidos são considerados como aqueles que possuem valor econômico agregado, por possibilitarem seu reaproveitamento, viabilizando os resíduos da biomassa transformados em matéria prima para diversos outros processos (SILVA et al., 2011; SCHNEIDER et al., 2012).

O resíduo necessita de destino adequado, e sua disposição no meio ambiente, através de emissões de matéria e energia depositada na atmosfera, água ou solo deve ocorrer nos padrões da legislação ambiental. Cada país ou região possui um resíduo específico devido à sua atividade agrícola ou industrial. Os resíduos agroindustriais após o processamento de matérias-primas apresentam maior valor agregado, e pela vocação natural que o Brasil possui para sua geração acredita-se que o potencial de ganhos para o país seja de grandes proporções (PELIZER et al., 2007; CASTRO, 2010; STROPARO, 2012; GONZALES et al., 2013).

Devido à elevada demanda pela industrialização e conseqüente exploração dos recursos naturais, uma quantidade muito elevada de resíduos tem se acumulado no meio ambiente. Resíduos orgânicos que não são reciclados podem ser reaproveitados, em muitos casos, como ingredientes em formulações de novos produtos e, por processos biotecnológicos, pode ser valorizado quando utilizados

como substratos para a geração de produtos como enzimas e antibióticos. Resíduos gerados nas atividades agroindustriais sejam eles sólidos ou líquidos, em virtude de serem ricos em matéria orgânica e nutrientes são utilizados pelas plantas e micro-organismos do solo (PRIMO et al., 2010; SANTOS et al., 2012).

O processo de enriquecimento em rejeitos agroindustriais utilizando-se micro-organismo pode ser realizado através de uma fermentação (cultivo) que possibilite a utilização desses rejeitos como substrato. Porém devem-se criar, após o enriquecimento, condições nas quais o resíduo enriquecido esteja protegido e livre das ações maléficas dos fatores que condicionam sua deterioração (CAMPOS et al., 2005; CAMPOS et al., 2012; HOFISKY, 2013).

Esses resíduos gerados podem ser usados como substrato para o crescimento celular. A matéria orgânica presente neste material é usada como fonte de energia para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa e dos produtos do metabolismo microbiano. Vários resíduos agroindustriais podem ser utilizados como substrato, como o bagaço de laranja, farelo de trigo e de arroz, farelo de soja, polpa de maçã, polpa de café, quirela do milho, bagaço de cana, bagaço de abacaxi, pedúnculo de caju etc (PANDEY 2002; TAVARES, 2012).

A obtenção de novos materiais, produtos, co-produtos e substâncias químicas a partir de resíduos agroindustriais têm encontrado espaço e vem sendo desenvolvida. Além da ampliação do mercado, pela disponibilização e valorização de novos produtos, o desenvolvimento de novos usos de produtos agropecuários e de tecnologias que revertam o conceito de resíduo para o de matéria-prima para a produção de novos materiais é imprescindível para otimizar a eficiência do agronegócio além de reduzir o impacto ambiental (SOFFNER, 2001; REGINA et al., 2009; F. ROSA. M. et al., 2011).

### **3.5.1 FARELO TRIGO**

No Brasil, aproximadamente 10 milhões de toneladas de trigo são beneficiadas por ano. Deste total, cerca de 75% é destinado à produção de farinha de trigo utilizada na alimentação humana, e os 25% restantes são considerados resíduos, comumente vendidos como farelo de trigo, segundo pesquisa realizada pela Associação Brasileira da Indústria do trigo (2012). Os subprodutos do processamento do grão de trigo (farinheta, farelo fino e farelo grosso) apresentam diferentes granulometrias e composições nutricionais. (ROSTAGNO et al., 2011; WESENDONCK, 2013).

Este ingrediente compreende as camadas mais externas do grão, incluindo a aleurona e algum endosperma aderido, sendo constituídos principalmente por arabinoxilanas (36, 5%) celulose (11%), lignina (3 a 10%) e ácidos urônicos (3 a 6%), além das proteínas. As arabinoxilanas do farelo de trigo apresentam conhecida propriedade de reter água e promover a viscosidade em soluções (BERGMANS et al., 1996; FERREIRA, 2013).

Como o consumo do trigo não se dá de forma direta, os grãos precisam ser processados através da moagem e refinamento para obtenção da farinha de trigo. É do interior dos grãos que é extraído a farinha. Neste processo, o resíduo gerado é a casca do grão, também conhecido como farelo de trigo. A farinha é comercializada para fins industriais e alimentícios enquanto o farelo é comercializado, sendo incorporado em rações animais, tendo em vista ser um material rico em fibras e proteínas (LIMA, 2003; GRAZIELA SILVA, 2007; ROSTAGNO et al., 2011).

### **3.5.2 FARELO DE ARROZ**

O farelo de arroz é obtido por meio de processos de parbolização do arroz. Neste processo o grão do arroz com casca é submetido ao tratamento hidrotérmico. O procedimento é feito geralmente quando o rendimento do grão de arroz inteiro é reduzido pela quebra do grão durante o descasque (SILVA et al., 2006; PACHECO, 2013).

O farelo de arroz é um dos resíduos gerados durante o processo de beneficiamento do grão de arroz. Possuem quantidades significativas de carboidratos, proteínas, lipídios, fibras insolúveis, vitaminas e minerais (SAUNDERS, 1990; LACERDA et al., 2010). As fibras do farelo de arroz são componentes que possuem boa capacidade de absorção de água e óleo e por isso podem contribuir para o desenvolvimento de uma enorme variedade de produtos industrializados que requerem estas propriedades. Algumas aplicações desse resíduo, como para nutrição animal, extração de proteína para uso alimentício e emulsificante, já são utilizadas como formas de valorização ((SOARES JUNIOR et al, 2008; NUNES et al., 2012).

Um dos subprodutos do beneficiamento do arroz tem grande potencial de tornar-se matéria-prima de baixo custo, enquadrando-se nos princípios da Química Verde (Química Sustentável) com importância fundamental na transição para uma matriz energética renovável e de baixo impacto ambiental (ZULLAIKAH et al., VICH, MANSOR, 2009; PEREIRA, 2013)

### 3.5.3 ÓLEOS RESIDUAIS VEGETAIS

Uma variedade de subprodutos, incluindo derivados de óleos vegetais, resíduos de destilaria de óleos tem sido utilizados na produção de muitos metabólicos microbianos. A disponibilidade e o tipo de matéria prima podem contribuir consideravelmente para custo de produção. Por outro lado, são despejados resíduos poluentes a cada ano por todo o mundo. O tratamento e a remoção destes resíduos também apresenta um alto custo para várias indústrias (MUKHERJEE et al.,2006; SOBRINHO, 2007).

Os óleos alimentares usados são uma matéria prima alternativa promissora aos óleos virgens, porque são mais baratos. Por outro lado, com a sua valorização não será necessário suportar os custos decorrentes da sua eliminação e/ou tratamento. No processo de fritura, o óleo é aquecido a altas temperaturas durante períodos relativamente longos. Por vezes, devido razões econômicas, o mesmo óleo é usado inúmeras vezes, o que acarreta diversas alterações físicas e químicas (FELIZARDO et al., 2006; LAM, LEE, MOHAMED 2010).

Algumas alterações físicas são observadas durante o aquecimento do óleo, o aumento da viscosidade, aumento do calor específico, alteração da tensão superficial e da cor. As reações que podem ocorrer são de três tipos: oxidação, polimerização e hidrólise. Triglicerídeos presentes no óleo são compostos orgânicos oxidáveis. A oxidação acelerada pela temperatura e pela luz provoca o envelhecimento do óleo devido ao contato com o oxigênio atmosférico. Quando o óleo é constituído por moléculas insaturadas, é mais propícia a ocorrência da sua oxidação, bem como a produtos degradados ( ALZUHAIR, 2007; OLIVEIRA, 2010).

A utilização dos rejeitos de óleo de fritura oriundos de restaurantes e empresas de gêneros alimentícios apresenta-se como uma alternativa para reciclagem deste contaminante ambiental devido a sua abundância e aos baixos custos. As propriedades dos óleos residuais podem variar em função de diversos fatores e podem influenciar na produção de vários bioprodutos. Uma vez constatado que o óleo já não é mais apropriado para consumo, o mesmo não deve ser descartado na rede pública de esgoto, pois provoca impactos ambientais significativos. Os óleos nos esgotos pluviais e sanitários emulsificam-se com a matéria orgânica, ocasionando entupimentos em caixas de gordura e tubulações (SABESP, 2011; WEBER, 2013).

## 4. REFERÊNCIAS

ANDRADE, L. A. OLIVEIRA, F. X; NEVES, C. M.L; FELIZ, L. P. Análise da vegetação sucessional em campos abandonados no agreste paraibano. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife. v. 2, n. 2, p. 135 - 142, 2007.

ABREU, L. **Influência de diferentes estratégias de cultivo na produção de lipase por staphylococcus warneri ex 17 e propriedades desta enzima após imobilização em suportes hidrofóbicas**. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado Curso de Microbiologia Agrícola e Meio Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

ALZUHAIR, S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**. v.1 n.1, p. 57-66. 2007

ALBERTON, D; MITCHELL, D. A; CORDOVA, J; ZAMORA, P. P; KRIEGER, N. Production of a Fermented Solid Containing Lipases of *Rhizopus microsporus* and Its Application in the Pre-Hydrolysis of a High-Fat Dairy Wastewater. **Food Technol. Biotechnol**, v. 48, n. 1, p.28-35, out. 2010.

AGUIAR, C. L; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Sistema Eletrônico de Revistas**, Curitiba PR, v. 18, n. 1, p.57-70, jun. 2000.

ALENCAR, A. A. **PRODUÇÃO DE BACITRACINA POR BACILLUS LICHENIFORMIS (UCP1010) UTILIZANDO MEIO ALTERNATIVO À BASE DE SORO DE LEITE**. 2011. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2011.

ALONSO, F.O.M; OLIVEIRA, E.B.L; DELLAMORA-ORTIZ, G.M; PEREIRA-MEIRELLES, F.V improvement of lipase productionat different stirring speedsand oxygen levels. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**. Rio de Janeiro, p. 09-18. 18 jan. 2005.

ALVARENGA, A. A. A; MARTÍNEZ, E. M; VIAY, M. Y. Q. LARA, J. M; BADILLO, E.V; OLIVAS, A. F. *Aspergillus* aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual. **Revista Mexicana de Ciências Agrícolas**, Mexico, v. 3, n. 1, p.1047-1052, 1 set. 2012.

ANDREATTI, F. R.L. **Saúde Aviária e Doenças**. 1ed. São Paulo- SP: Roca, 2007. 98p.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Biosci**. Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 66-75, July./Sept. 2007.

ARAÚJO FILHO, J. A. D; CARVALHO, F. C. D; Garcia, R; Sousa, R. A. D. Efeitos da manipulação da vegetação lenhosa sobre a produção e compartimentalização da fitomassa pastável de uma caatinga sucessional. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.11-19, 2002.

AZEVEDO, N; FERREIRA, L.O; KROPF, S.P; HAMILTON, W.S. Pesquisa científica e inovação tecnologia: a via brasileira de biotecnologia. **Dados**, v.45.n.4, p. 139-175, 2002.

BAPTISTA, N. M. Q; SANTOS, A. C; ARRUDA, F. V. F. Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos. **Scientia Plena**, Recife PE, v. 8, n. 1, p.01-07, 13 jan. 2012.

BARATTO, C M; SALAMONI, S. P; COSTA, R. O; BORGES, C; LOCATELLI, G.O. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, Joaçaba, v. 11, n. 2, p.15-28, 2011.

BARBOSA, J. M. P. **PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE *BACILLUS SP.* (ITP-001)**. 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) Universidade de Tiradentes, Aracajú Se, 2011.

BARROS, R. P. Diversidade de fungos em um vertissolo com adição de vinhaça na cultura de cana-de-açúcar ( *Saccharum officinarum L.*). **Revista Uniabeu**, Alagoas, v. 5, n. 10, p.181-195, 2012.

BERLINCK, R. G. S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 64, n. 3, p.27-30, fev. 2012.

BISATTO, R. **POLIÉSTERES VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA HETEROGÊNEA**. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

BOTELLA, C; DIAZ, A; ORY, I; WEBB, C; BLANDINO, A. Xilanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p.98-101, 2007.

BOUWER, E. J; ZEHNDER, A. J. B. Bioremediation of organic compounds - putting microbial metabolism to work. **TIBTECH**, v. 11, p. 360-367, 1993.

BOTTCHER, D; BORNSCHEUER, U.T. Protein engineering of microbial enzymes. **Current Opinion in Microbiology**, v.13, n.3, p. 282-474, 2010.

CARVALHO, P.O; GUARDA, E.A; MONTEL, A.L.B; SOUZA, D.A; GUARDA, P.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 22-24, 2003.

CAMARGO, J. F. The Actual State of Biotechnology In Brazil and the World. **Cadernos De Direito**, v. 02, n. 1, p.148-162, 2012.

CAMELINI, C. M. **PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO FUNGO *AGARICUS SUBRUFESCENS* POR PROCESSOS FERMENTATIVOS SÓLIDO E SUBMERSO PARA OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS BIOATIVOS.** 2010. 215 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

CAMPOS, A. R. N; SANTANA, R. A.C; DANTAS, J.P; OLIVEIRA. L. S.C; SILVA, F. L. Enriquecimento Protéico do Bagaço do Pendúnculo de Caju por Cultivo Semi-Sólido. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.5, p.1-10, 2005.

CAPRA, F; RIBEIRO, N.P; VARGAS, G.D .L.P; OLIVEIRA, D; FREIRE. D. M.G; LUCCIO, M.D. Efeito da Umidade, Temperatura e Suplementação do meio na Produção de Lipase por *Penicillium simplicissimum* Utilizando Torta de Soja como Substrato. **Engenharia de Alimentos**, p.01-07, 2009.

CAPUTO, C. **Avaliação da composição do meio de cultura para produção de lipase por *candida rugosa*.** 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado no Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

CARDINALI, S. M. M; PINTOB. P; GARCIA, T. C. M; FRENEDOZO, R. C. Construção de Revista Eletrônica Científica Mediando Processos de Ensino-Aprendizagem em Biotecnologia e Meio Ambiente: uma abordagem no ensino técnico CEFET /MG. **Ciência & Tecnologia**, Cruzeiro do Sul MG, v. 5, n. 3, p.617-626, mar. 2012.

CASTRO, A. M. PEREIRA J. N. Produção, Propriedades e Aplicação de Celulases na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais. **Quim. Nova**, v.33, n.1, p.181-188, 2010.

CTEM, **Centro de Tecnologia Ambiental**. Disponível em < <http://www.ctem.gov.br/>> acesso em 04 de Julho de 2012.

CHERRY, J.R; FIDANTSEF, A.L. Direct evolution of industrial enzymes: na upade. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p. 438-443, 2003.

COSTA, M; OLIVEIRA A. C. Patentes em Biotecnologia: uma Análise da Situação brasileira atual. Disponível em<<http://www.abifina.org.br/factoNoticia.asp?cod=244>>. Acesso em: 01 out 2012.

COELHO, M. A. Z. Utilização de Resíduos agroindustriais nos processos Biotecnológicos. **J. Technol. Manag. Innov.** Rio de Janeiro, p. 118-127. Fev. 2007.

COSTA, S. C. C; GUTIERREZ, I. E. M; NETO, A. G. Ensino, Empresas e Patentes em Biotecnologia no País. **Geintec**, São Cristovão Se, v. 2, n. 2, p.138-153, mar. 2012.

COLLA, L. M; REINEHR, C. O; COSTA, J. A. V. Applications and Production of Microbial Lipases. **Ciatec- Upf**, Passo Fundo Rs, v. 4, n. 2, p.1-14, 2012.

CORREIA, M. S. **ESTRUTURA DA VEGETAÇÃO DA MATA SERRANA EM UM BREJO DE ALTITUDE EM PESQUEIRA – PE.** 1996. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 1996.

CRUZ, A. C. R; GUSMÃO, L. F. P. Fungos conidiais na Caatinga: espécies associadas ao folhedo. **Acta Bot. Bras.** v. 4, n. 23, p.999-1012, 2009.

CRUZ, S. M. **IMOBILIZAÇÃO DE CAL B EM MICRORREATORES.** 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado de Engenharia Química) Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2012.

CUZZI, C; LINK, S; VILANI, A; ONOFRE, S. B. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* d.c. (asteraceae). **Global Science And Technology**, Francisco Beltrão Pr., v. 4, n. 2, p.47-57, ago. 2011.

DAMASO, M. C. T; PASSIANOTO, M.A; FREITAS, S.C; FREIRE, D. M. G; LAGO, R. C. A; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production By solid-state fermentation. **Brazilian Journal Of Microbiology**, p. 676-680, 2008.

DHIMAN.S.S; SHARMA.J; BATTAN.B. industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. **BIORESOURCES**, v.3, n.4. p.1377-1402, 2008.

ELLAIHAH, P; PRABHAKAR, T; RAMAKRISHNA, B; TALEB, A. T; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v.39, 525–528, 2004.

FÁRI, M. G; KRALOVÁNSZKY, U. P. The founding father of biotechnology: Károly (Karl) Ereky. **International Journal of Horticultural Science**, v. 12, n. 1, p. 9-12, 2006.

FACCHIN, S; ALVES, P.D.D; SIQUEIRA, F.F; BARROCA, T.M; VICTÓRIA, J.M.N; KALAPOTHAKIS, E. Biodiversity and secretion of enzymes with potential utility in wastewater treatment. **Open Journal Of Ecology**, Belo Horizonte, p. 34-47. 08 jan. 2013

FEITOSA, I. C; BARBOSA, J. P; ORELLANA, S. C. LIMA, A. S; SOARES, C.M.F. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá PR, v. 32, n. 1, p.26-31, jan. 2010.

FELIZARDO, P. Production of biodiesel from waste frying oils. **Waste Management.** v. 26 n.5, p. 487-494, 2006.

FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa.** 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado de Engenharia de Processos) Universidade de Tiradentes, Aracaju, Se, 2009.

FERNANDES, M.L.M. **produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2006. 130f. Dissertação (Doutorado em Química)- Setor de Ciências Exatas - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

FREITAS, M.F.M. **produção de β galactosidade por *Kluyveromyces lactis* nr1 y1564 em soro de leite e imobilização em quitosana**. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado no Curso de Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Ceará Fortaleza, 2013.

GARRIDO, R. G; GARRIDO, F. S. R. G. Uma Abordagem Ética sobre as Tecnologias Agrícolas. **Tecnologia & Cultura** (CEFET/RJ) Disponível em: <http://portal.cefet-rj.br/files/comunicação/revista/pdf> acesso em: out. 2012.

GONÇALVES M.G.A; ANDREATTI FILHO. R. L. Aspergilose visceral causado por *Aspergillus flavus* em Marreco Carolina (Aix sponsa). **Acta Scientiae Veterinariae**, Botucatu Sp, v. 2, n. 35, p.253-256, jan. 2007.

GIONGO, V; JARBAS. T; CUNHA. F; MENDES. A. S. M; GAVA, C. A. T. Carbono no Sistema Solo-Planta no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física**, p. 1233-1253, 2012.

GUIMARÃES, L. H.S; NOGUEIRA, S. C.P; MICHELIN, M; RIZZATTI, A.C; SANDRIM, V.C; ZANOELO, F.F; AQUINO, A.C.M.M; JUNIOR; A.B; POLIZELI, M.L.T.M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal Of Microbiology**. São Paulo, p. 474-480. mar. 2006.

GUIMARÃES, Í.C. O; SOUZA, A. R. M; CORNÉLIO, V. M.O; VILLELA, J. P. V. A. Identificação de *Aspergillus* spp. toxigênico em arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Lavras Mg, v. 30, n. 8, p.60-62, jan. 2010.

GOMES, F. M; PAULA, A. V; SILVA, G.S; CASTRO, H. S. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Quim. Nova**, Lorena - Sp, Brasil, v. 29, n. 4, p.710-718, 31 mar. 2006.

GONZALES, A. D. F; VITAL, A, V.D; LIMA, V. J, M; RODRIGUES, M, B. F. Desenvolvimento sustentável para o resgate da cultura do cacau baseado no aproveitamento de resíduos. **Interfaces Científicas saúde e Ambiente**, Aracaju Se, v. 1, n. 2, p.41-52, 2013.

GOTTSCHALK, L.M F; SOUZA, E. F; VIANA, L.A.N.; TERZI, S.C. Comparação da produção das enzimas xilanase e feruloil esterase em fermentação em estado sólido e submersa pela cepa mutante *Aspergillus niger* 3T5B8. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, Rio de Janeiro, p.01-04, 02 ago. 2013.

GAUR, R.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Process Biochemistry**, v. 43, P. 1040–1046, 2008.

GUPTA, R; GIGRAS, P; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1-18, 2003.

HAKI, G. D; RAKSHIT, S. K. Developmrrnts industrially important ther mostable enzymes: a review, **Biosource Technology**, n. 8, v. 89, p. 17-34, 2003

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

HOFISKY, A. V; SILVA, F.L.H; GOMES, J.P; SILVA, O.S; CARVALHO, J.P.D; LIMA, E.E. Cinética de secagem do resíduo de abacaxi enriquecido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande Pb, v. 17, n. 6, p.640-643, 2013.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their indudtrial applications: Na overview. **Applied Biochesmistry and Biotechology**. V. 118. P. 155-170, 2004.

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

HORCHANI, H; MOSBAH,H; SALEM, N.B; GARGOURI,Y; SAYARI,A. Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. India, p. 237-245. abr. 2009.

IBGE, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em < <http://WWW.ibge.gov.br/>>.2010. Acesso em 05 de Julho de 2012.

INFANTE, J; SELANI, M.M; TOLEDO, N.M.V; SILVEIRA-DINIZ, M.F; ALENCAR, S.M; SPOTO, M.H.F. Atividade antioxidante de resíduos agroindustriais de frutas tropicais. **Alim. Nutr.= Braz. J. Food Nutr**, Araraquara, v. 24, n. 1, p.01-06, 2013.

IPA, **Instituto Agrônômico de Pernambuco**. Disponível em <<http://www.ipa.br/>>. 2008. Acesso em 05 de Julho de 2012.

JAEGER, K. E. KOLMAR, H. A. generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, p. 1177-1182, 2005.

JAEGER, K.E; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.16, p. 396 – 403,1998.

JESUS, J. G. R; LESSA, G.S; RODRIGUES, T.B; FERRÃO-GONZALES, A.D; FREIRE, E; HANNA, S.A; MOREAU, V.H. Seleção e identificação de micro-organismos produtores de amilases isolados da microbiota associada a resíduos agrícolas de cacau e dendê. **Diálogos & Ciência**, Salvador Bahia, n. 33, p.08-12, 2013.

JUNIOR, M.S.S; BASSINELLO, P.Z; LACERDA, D.B.C.L; KOAKUZU, S.N; GEBIN, P.F.C; JUNQUEIRA, T.L; GOMES, V.A. Características físicas e tecnológicas de pães elaborados com farelo de arroz torrado, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 815-828, out./dez. 2008.

JUNIOR, A.C. **IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *CANDIDA ANTARCTICA* BEM QUITOSANA PARA OBTENÇÃO DE BIODIESEL POR TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA**. 2007. 122 f. Dissertação (Mestrado de Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2007.

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.

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

LAM, M. K; LEE, K. T; MOHAMED, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: **Biotechnology Advance**. v 28 n.4, p. 500-518 2010.

LACERDA, D. B. C. L; JUNIOR, M.S.S; BASSINELLO,P.Z; CASTRO,M.V.L; SILVA-LOBO, V.L; CAMPOS, M.R.H; SQUEIRA, C.B.S. Qualidade De FarelOs De Arroz Cru, Extrusado e Parboilizado, e-ISSN 1983-4063 – **Revista Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v. 40, n. 4, p. 521-530, dez. 2010.

LEVIN, L; DIORIO, L; GRASSI, E; FORCHIASSIN, F. Grape stalks as substrate for white rot fungi, lignocellulolytic enzyme production and dye decolorization. **revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 44, n. 2, p.105-112, 2012.

LINK, S; ONOFRE, S. B. Microrganismos epifíticos da vassourinha - *Baccharis dracunculifolia* D. C.(Asteraceae). **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Francisco Beltrão PR, v. 3, n. 1, p.131-143, abr. 2010.

LOPES, F. C. **Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos**. 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado no Curso de Ciências) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2011.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. Dissertação 2006 129 f. (Mestrado em Processos Biotecnológicos) Universidade Federal do Paraná, 2006.

MACEDO, L. N; OLIVEIRA, A.C.P; FERREIRA, A.D.F; DAMASO, M.C.T; COURI, S. Estudo da Influência de Variáveis de Processo na Produção de Lipases por Fungo Filamentoso. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 07. 2009, Rio de Janeiro. **Anais...** . Natal RN: Embrapa, 2009. p. 01 - 05.

MAYOR, F. As biotecnologias no início dos anos noventa: êxitos, perspectivas e desafios. **Estudos Avançados**, v.6, n. 16, p: 7-28, 1992.

MARIETTO G.G.A; ANDREATTI F; RAPHAEL L. Aspergilose visceral causado por *Aspergillus flavus* em marreco Carolina ( Aix sponsa). **Acta Scientiae Veterinarie**. Botucatu, SP, v.2,n.35, p. 253-256, jan, 2007.

MARANGON, G. P; FERREIRA, R.L.C; SILVA; J.A.A; LIRA; D.F.S; SILVA; E.A; LOUREIRO, G.H. Estrutura e padrão espacial da vegetação em uma área de caatinga. **Floresta**, Curitiba Pr, v. 43, n. 1, p.83-92, 05 fev. 2013.

MATOS, A. T. Tratamento de Resíduos Agroindustriais. Curso Sobre Tratamento de Resíduos Agroindustriais. **Fundação Estadual do meio Ambiente**. Viçosa, 34p. 2005.

MARTINS, P. A. **Caracterização do secretoma de *aspergillus niger* crescido em bagaço de cana e purificação de xilanases de interesse biotecnológico**. 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado no Curso de Biologia Molecular) Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, 2012.

MAHADIK, N. D; PUNTAMBEKAR, U.S; BASTAWDE, K.B; KHIRE, J.M; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, India, v. 38, n. 5, p.715-721, dez. 2002.

MAHADIK, D. N; BASTAWDE, K, B; PUNTAMBEKAR, U. S; KHIRE, J.M; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v.39, 2031–2034, 2004.

MELLO, C. M. A; SILVA, I.R; PONTES, J.S; GOTO, B.T; SILVA, G.A; MAIA, L.C. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em área de caatinga, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Natal Rn, v. 26, n. 4, p.938-943, 20 jul. 2012.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F; GIORDANO, R. L. C.. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 2, p.245-251, 2013.

MESSIAS, J. M; COSTA, B.Z; LIMA, V.M.G; GIESE, E.C; DEKKER, R.FH; BARBOSA; A.M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina PR, v. 32, n. 2, p.213-234, 2012.

MONTEIRO, M. C. **IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DOS GÊNEROS ASPERGILLUS E PENICILLIUM EM SOLOS PRESERVADOS DO CERRADO**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado no Curso de Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras Mg, Lavras Mg, 2012.

MOURA, L. F. W. G; OLIVEIRA, M.V; LÔ, M.M; MOTA, J.G..S.M; MAGALHÃES, E.A; LIMA, .M.C.L; MAGALHÃES, F.E.A. Bioprospecção de atividade lipolítica de fungos anemófilos isolados do centro vocacional tecnológico (cvt) de tauá-ce. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande Pb, v. 15, n. 02, p.157-165, 2013.

MÜLLER, R. L. **Obtenção de mono e diacilgliceróis via glicerólise enzimática como alternativa para aproveitamento da glicerina obtida na produção de biodiesel**. 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado no Curso de Tecnologia Ambiental) Universidade de Santa Cruz do Sul - Santa Cruz do Sul, RS 2013.

MUKHERJEE, S; DAS, P; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends Biotechnol.** V. 24, p. 509-515. 2006.

NAGARAJAN, S. New Tools for Exploring“Old Friends—Microbial Lipases. **Appl Biochem Biotechnol**, Tamil Nadu, India, p.01-34, 2012.

NAQVI, S. H. A ; DAHOT, M.U; YAKOUB KHAN, M; XU, J.U; RAFIQ, M. Usage of sugar cane bagasse as an energy source for theproduction of lipase by *Aspergillus fumigatus*. **Pak. J. Bot**, Shanghai, China., v. 1, n. 45, p.279-284, 2013.

NELSON, D.L; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3a ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p.

NEGI, S; BANERJEE, R. Optimization of Amylase and Protease Production from *Aspergillus awamori* in Single Bioreactor Through EVOP Factorial Design Technique. **Food Technol. Biotechnol**, India, v. 44, n. 2, p.357-261, 14 mar. 2006.

NUNES, R. M. APROVEITAMENTO DE FARELO DE ARROZ NA FABRICAÇÃO DE PAPEL ARTESANAL. In: CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE, 5., 2012, Tocantins. **Congresso**. Poços de Caldas: Issn, 2012. v. 1, p. 01 - 04.

OLIVEIRA, A. N; OLIVEIRA, L. A; ANDRADE, J. S; CHAGAS-JUNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 61-66, 2007.

OLIVEIRA, A. C. D; VARGAS, J. V. C; RODRIGUES, M. L.F; MARIANO, A. B. Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande Pb, v. 15, n. 1, p.19-26, 2013 .

OLIVEIRA, A. C. D; WATANABE, F. M. F; RODRIGUES, M. L. F. Comparação entre fermentação no estado sólido e fermentação submersa para produção de  $\alpha$ -amilases por *penicillium* sp.e caracterização da enzima. **Biociências, Biotecnologia e Saúde**, Paraná, n. 1, p.01-12, 2011.

OLIVEIRA, F. R. **Prospecção de fungos para o controle de *Anticarsia gemmatilis* hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado no Curso de Agrobiologia) Departamento de Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria RS, 2013.

OLIVEIRA, E. A. **imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de rhodotorula e aplicação na produção de fruooligossacarídeos**. 2007. 87 f. Dissertação de ( Mestrado no curso em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Campinas, São Paulo,2007.

OLIVEIRA, M. A; DONEGA, M.A; PERALTA, R.M; SOUZA, C.G.M. Produção de inóculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet - CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 84-87, 2007.

ORLANDELLI, R. C; SPECIAN, V; FELBER, A.C; PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Sabios: Rev. Saúde e Bio**, Maringá, v. 7, n. 3, p.97-109, 2012.

PARK, Y.S; KANG, S.W; LEE, J.S; HONG, S.I. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology And Biotechnology**, Seoul Korea, v. 58, n. 6, p.761-766, 22 jan. 2002.

PAQUES, F. W; MACEDO, G. A. Plant lipases from latex: properties and industrial applications. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PATEL, R.N; Microbial enzymatic sythesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Technology Enzyne and Microbial**. v.31, n. 6, p. 804-826, 2002.

PACHECO, S. M. V. **Produção, caracterização e imobilização de lipase de fungo filamentoso isolado do efluente de abatedouro de frango**. 2012. 244 f. Tese (Doutorado no Curso de Engenharia Química) Departamento de Tecnológico de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

PADILHA, G. S; FERREIRA, J.F; CASTIGLIONI, G. L; ALEGRE, R. M; TAMBOURGI, E.B. Avaliação da lipase extracelular de *Pseudomonas cepacia* para purificação em sistema bifásico aquoso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas Sp, v. 1, n. 31, p.16-22, 2011.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.3636, p.1-4, 2002.

PANDEY, A. Enzyme Technology.1. ed. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de Resíduos Agro-Industriais em Processos Biotecnológicos como Perspectiva de Redução do Impacto Ambiental. **Journal of Technology Management & Innovatium**, v.2, 2007.

PEREIRA FILHO, J. M; SILVA, A.M.A; CEZAR, M.F. Manejo da Caatinga para produção de caprinos e ovinos. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim**, Paraíba, v. 14, n. 1, p.77-90, 2013.

PEREIRA, E. B. **Enzimas e suas aplicações cinéticas enzimáticas**. 2001. 40 f. Monografia (Graduação no Curso de Engenharia de Alimentos) Departamento de Engenharia Química e Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

PEREIRA, R. A; FARIAS, C.A.S; PEDROSA, T.D; FARIAS, E.T.R. Maturação de compostos orgânicos de resíduos agroindustriais. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró Rn, v. 8, n. 1, p.264-268, mar. 2013.

PEREIRA, A. R. B; FREITAS, D. A. F. Uso de micro-organismos para a biorremediação de ambientes. **Educação e Tecnologia Ambiental**, Universidade Federal de Lavras Mg, v. 6, n. 6, p.975-1006, 2012.

PEREIRA, J. E. S. **Síntese de biodiesel a partir do farelo de arroz via catálise enzimática**. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Tecnologia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre Rs, 2013.

PESSOA, C; GARRIDO, R.G. Policiamento Genético: **Revista de Ciências Sociais**, Bahia, n. 37, p.103-114, 2012.

PINHEIRO, T. L. F. **Produção de lipase por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* com o microrganismo**. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado no curso de Engenharia de Alimentos) Universidade Regional Integrada, Erechim, 2006.

PRIMO, D. C; FADIGAS, F.S; CARVALHO, J.C.R; SCHIMIDT, C.D.D; FILHO, A.C.S.B. Avaliação da qualidade nutricional de composto orgânico produzido com resíduos de fumo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB, v. 14, n. 7, p.742-746, 15 fev. 2010.

POLIZELI, M.I.T.M; RIZZATTI, A.C.S; MONTI,R; TERENCEI, .H.F; JORGE, .J.A; AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, Berlin, v. 67, n. 5, p.577-591, jan. 2005.

RAJENDRAN, A. PALANISAMY, A. THANGAVELU, V. Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Vol. 52, n.º 1, p. 207-219. 2009.

REZENDE, E. F; COUTO; F.A; BORGES, J.G; SILVA, D.M; BATISTA, L.R. Potencial enzimático e toxigênico de fungos isolados de grãos de café. **Coffe Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p.69-77, jan. 2013.

REGINA, M; BROETTO, F; SERMANNI-GIOVANNOZZI, G; MARABOTINI, R; PERANNI, C; LINDE, G.A; COLAUTO, N.B; MEIRELLES-PACCOLA, L.D. Atividade de enzimas oxidativas do *Lentinula edodes* em substratos agroindustriais. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 4, p.881-880, dez. 2009.

RIGO, E. **Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja**. 2009. 163 f. Tese (Doutorado no Curso de Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - Sc, 2009.

RIBEIRO, B. D; CASTRO, A. M; SALGADO, A.M; COELHO, M.A.Z. Aplicação de Enzimas: Propostas para Disciplina Experimental. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, p.1-89, 11 fev. 2013.

RITTER, A. C. **Potencial Toxogênico de *Aspergillus Flavus* testados em diferentes meios de condições**. 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado no Curso de Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) Departamento de Pós Graduação de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre Rs, 2007.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. 2010. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

RODRÍGUEZ, P; VENANCIO, A; KOZAKIEWICZ, Z., LIMA, A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section Flavi isolated from Portuguese almonds. **Int. J. Food Microbiol.**129:187-193, 2007.

RODAL, M. J. N.; COSTA, K. C. C.; SILVA, A. C. B. L. Estrutura da vegetação caducifólia espinhosa (Caatinga) de uma área do sertão central de Pernambuco. **Hoehnea**, São Paulo. v. 35, p. 209 - 217, 2008.

ROSTAGNO, H.S.**Tabelas brasileiras para aves e suínos**: composição dos alimentos e exigências nutricionais 3.ed. Viçosa: UFV, p. 252, 2011.

ROSA, M. F; SOUZA FILHO, M S. M; FIGUEIREDO, M. C. B; MORAIS, J. P. S; SANTAELLA, S.T; LEITÃO, R. C. Valorização de resíduos da agroindústria. In: II simpósio internacional sobre gerenciamento de resíduos agropecuários e agroindustriais –II SIGERA. Foz do Iguaçu. Artigo. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. p. 98 – 105 .2011.

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

SAID, S; PIETRO, R. Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico, **Eventos**, p.122, 2002.

SABESP. Projeto Fabriquinha de sabão da ABB recicla óleo vegetal usado. **Revista óleos e Gorduras: Alimentos e Tecnologia**. V.112 n.104. p.24-25, 2011.

SALIHU, A; ALAM, MD. Z; ABDULKARIM, M. I; SALLEH, .H.M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation And Recycling**, Zaria, Nigeria, p.36-44, 2012.

SANTOS, G. J; PEREIRA, R. E. P. Levantamento de *Aspergillus fumigatus* e *Strongyloides sp.* Em jabutis mantidos em cativeiro no bosque municipal dr. Belírio guimarães brandão- zoológico municipal da cidade de garça- SP. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, São Paulo, n. 16, p.01-29, 2012.

SANTOS, L; KOTOVICZ, V; BARANA, A.C; ALMEIDA, M.M. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 6, n. 1, p.655-664, 2012.

SANTOS, T.C; ROCHA, T.J. O; OLIVEIRA, A.C; FILH, G.A; FRANCO, .M. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (theobroma cacao). **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v. 80, n. 1, p.65-71, mar. 2013.

SANTOS, T. C; FILHO, G. A; ROCHA, T. J.H; FONSECA, S. F; FRAN, M. Palma forrageira como matéria prima para a produção de enzimas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró Rn, v. 7, n. 2, p.270-276, 2012.

SANTOS, G O; ZANELLA, M. E; SILVA, L. F. F. S. Correlações entre Indicadores Sociais e o Lixo Gerado em Fortaleza, Ceará, Brasil. Rede – **Revista Eletrônica do Prodema**, jun. 2008, vol. 2, n. 1, p. 45-63. ISSN. 1982-5528.

SANTOS, V.L.; LINARDI, V.R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents -identification and degradation potential. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1001-1006, 2004.

SAXENA, R. K; DAVIDSON, W.S; SHEORAN, A; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, London, v. 39, p. 239-247, 2003.

SBARDELOTTO, M; AGNOL, A.D; VENTURIN, B; MULINARI, J; TREICHEL, E; VARGAS, G.D.L.P. Avaliação da produção de lipase microbiana a partir de *Aspergillus sp.*, utilizando torta de canola como substrato. **Biochemistry And Biotechnology Reports**, Rio Grande do Sul, v. 2, n. 3, p.293-296, mar. 2013.

SCHEUFELE, F. B. **Bioconversão de Resíduos agroindustriais por micro-organismos do bioma amazônico produtores de enzimas lignocelulolíticas**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado n Curso de Engenharia Química) Departamento de Centro de Engenharias Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Florianópolis, 2012.

SCHNEIDER, C. F; SCHULZ, D.G; LIMA, P.R; JUNIOR, A.C.G. Formas de gestão e aplicação de resíduos da cana-de-açúcar visando redução de impactos ambientais. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró Rn, v. 7, n. 5, p.08-17, 2012.

STROPARO, E. C; BEITEL, S.M; REZENDE, J.T.V; KNOB,A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p.2267-2278, dez. 2012.

SILVA, G. K. C ; RAMALHO, S.A ; GUALBERTO, N.C ; GOMES, E.B ; MIRANDA, R.C.M ; NARAIN, N. Utilização de Resíduo Agroindustrial como Materia Prima Para a Produção de Ácido Cítrico por *Kluveromyces marxianus* URM 4404. **Scientia Plena**, São Cristovão, v. 8, n. 5, p.1-6, 2012.

SILVA, G. **Aproveitamento biotecnológico de resíduos agroindustriais na produção de glucoamilase**. 2006. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2006.

SILVA, I. F. **Produção de amilase por *Bacillus Amyloliquefaciens* utilizando torta de macaúba (*acrocomia Aculeata*) e farinha de pupunha (*Bactris gasipaes*) como substratos**. 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado no Curso de Química) Universidade Federal Dos Vales Do Jequitinhonha E Mucuri, Diamantina, 2012.

SILVA, J. V. H; BITTAR, A.P; SERRA, J.C.V; JUNIOR, J.C.Z. Diagnóstico do reaproveitamento de resíduos com potencial energético no município de Palmas-TO. **Engenharia Ambiental**, v.8, n.2, p.226-233, 2011.

SILVA, J.J; SANTANA, T.T; OLIVEIRA, A.A. C; ALMEIDA, P.H; SOUZA, S.G.H; LINDE, G.A; COLAUTO, N.B; VALLE, J.S. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com cascas de café. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar**, Umuarama, Pr., v. 15, n. 2, p.191-196, 2012.

SILVA, M. B; RONDON, J. N. Utilização de fungo de bambu na biorremediação de solo contaminado. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Mato Grosso do Sul, v. 10, n. 10, p.2175-2184, 2013.

SILVEIRA, J.M.F.J; POZ, M.E.S; MASSAGO, F.K; CAMPOS, R. Caracterização da trajetória tecnológica da biotecnologia agrícola por meio de redes de patentes. **Gestão & Políticas Públicas**, Campinas, n. 2, p.163-187, 2011.

SINGH, A. K; MUKHOPADHYAY, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. **Appl Biochem Biotechnol**, Gujarat, India, n. , p.486-520, 2012.

SINGH, H. M. fungal bioremediation. **John Wiley & Sons, Inc. Hoboken**, New Jersey.617p. 2006.

SOARES, I.A; FLORES, A.C; ZANETTIN, L; PIN, H.K; MENDONÇA, M.M; BARCELOS, R.P; TREVISON, L.R; CARVALHO, R.D; SCHAUREN, D; ROCHA, C.L.M.S.C; BARONI,S. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Toledo – PR. v. 3, n. 30, p.700-705, 2010.

SOARES, C.M.F; CASTRO, H.F; MORAES, F.F; ZANIN, G.M. Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore Silica. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, Maringá Pr, v. 77, n. 79, p.745-757, set. 1999.

SOCCOL, C.R; VANDENBERGHE, L.P.S; MEDEIROS, A.B.P; KARP, S.G; BUCKERIDGE, M; RAMOS, L.P; PITARELO, A.P; FERREIRA-LEITÃO, V; GOTTSCHALK, L.M.F; FERRARA, M.A; BON, E.P.S; MORAES, L.M.P; ARAÚJO, J.A; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, p.4820-4825, 2010.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 205-218, 2003.

SOETAN, K.O; AIYELAAGBE, O.O; OLAYA, C.O. A review of the biochemical, biotechnological and other applications of enzymes, **African Journal of Biotechnology**, V.9 N.4, p. 382-393, 2010.

SOUZA, F. M.; AQUINO, L. C. L.. Potencial da farinha de sementes de mangaba para a produção de lipase de *Aspergillus niger*. Influência da temperatura e umidade no processo. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 8, n. 12, p.121-512, 2012.

SOUZA, V. F; REBELLO, F. F. P; ASCHERI, J. L. R. Fitase: aspectos gerais e suas principais aplicações. **Revista Acta Tecnológica - Revista Científica**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 2, p.53-66, 2011.

SOUZA, V. F; REBELLO, F. F. P; ASCHERI, J. L. R. Fitase: aspectos gerais e suas principais aplicações. **Revista Acta Tecnológica - Revista Científica**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 2, p.53-66, 2011.

SOUZA, L. P; ASTOLFI F. S; PEREIRA, J. O. **Diversidade bacteriana endofítica de diferentes plantas tropicais. Resumos da 7ª Reunião Especial da SBPC Manaus-AM**, 2001.

SOBRINHO, H. B. S. **UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO DE BAIXO CUSTO PARA A PRODUÇÃO DE BIOSUFACTANTE POR CANDIDA SPHAERICA**. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2007.

SUBHASH, G. V; MOHAN, S. V. Biodiesel production from isolated oleaginous fungi *Aspergillus sp.* using corncob waste liquor as a substrate. **Bioresource Technology**, India, v. 28, n. 2, p.9286-9290, 23 jun. 2011.

SAUNDERS, R. M. The properties of rice bran as a foodstuff. **Cereal Foods World**, v. 35, n. 7, p. 632-636, 1990.

TAVARES, A.N.D; FONSECA, J.S; FONSECA, T.R.B; SOUZA, R.A.T; BARRONCAS, J.F; SILVA, T.A; TEIXEIRA, M.F.S. Extracellular Enzymes of Anamorphic Fungi Isolated from *Morinda citrifolia* L. **Biochemistry And Biotechnology Reports**, Manaus Am, v. 1, n. 2, p.01-06, 2012.

TAVARES, I. M. C. **Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos em fermentação em sólido estado por *Aspergillus niger* a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial *decróton grewoioides***. 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado no Curso de Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga Bahia, 2012.

TAVARES, L. L. P. **Produção de lipase por *Bacillus licheniformis*(UCP 1014) a partir de meios a base de resíduos da indústria de sorvete**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado no Curso de Processo de Desenvolvimento Ambiental, Departamento) Núcleo de Pesquisas de Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife PE, 2011.

TREICHEL, H; OLIVEIRA, D; MAZUTTI, M.A; LUCCIO, M.D; OLIVEIRA, V. A Review on Microbial lipases Production. **Food Bioprocess Technol**, Campinas São Paulo, v. 3, n. 2, p.182-196, mar. 2010.

TOSTES, A.A. M. **Estudo da Hidrólise enzimática em soro de queijo utilizando lactases Prozyn e Lactozyn**. 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado) – Curso em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, MG, 2006.

TOSCANO, L; GOCHEV, V; MONTERO, G; STOYTCHIEVA, M. ENHANCED PRODUCTION OF EXTRACELLULAR LIPASE. **Biotechnol. & Biotechnol**, Mexico, v. 28, n. 4, p.2243-2247, 25 jan. 2011

USCÁTEGUI, Y; JUNCA-JIMENEZ, C; SUÁREZ, C; CORREA-PRIETO, E. valuation of the induction of lipolytic enzymes from a *Pseudomona aeruginosa* isolated from african palm fruit (*Elaeis guineensis*). **Vitae,'revista' de 'la' facultad' de 'química' farmacéutica**, Madellin Colombia, v. 19, n. 3, p.280-286, 2012.

VECCHIA, R. D; NACIMENTO, M. G; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, vol. 27, nº4, p.623-630, 2004.

VECCHIA, A. D; CASTILHOS F. R. Contaminação fúngica em granola comercial. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**, Campinas São Paulo, v. 2, n. 27, p.324-327, jun. 2007.

VICHI, F. M., MANSOR, M. T. C. Energia, meio ambiente e economia: o Brasil no contexto mundial. **Química Nova**, v. 32, p. 757-767, 2009.

VITA, C. E. **Enzimas pécticas de *Aspergillus kawachii*: aislamiento purificación y caracterización de pectinesterasa**. 2013. 165 f. Tese (Doutorado no Curso de Ciências Químicas) Departamento de En El Centro de Investigaciones Y Desarrollo En Fermentaciones Industriales (cindefi), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, 2013.

WANDERLEY, M. D; NEVES, E; ANDRADE, C. J. ASPECTOS DA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ENZIMAS. **Revista Hestia Citino**, Barra do Bugre Mt, v. 1, n. 1, p.30-36, 2011

WAACK, R. S.; AMOROSO, S. Desenvolvendo Sustentabilidade. **Parcerias Estratégicas. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**, Disponível em: [http://www.cgee.org.br/arquivos/p\\_20\\_1.pdf](http://www.cgee.org.br/arquivos/p_20_1.pdf). Acesso em 01/2012.

WEINGARTNER, V. **Produção, Purificação e Identificação de mananase obtida por fermentação no estado sólido utilizando cascas de soja e *aspergillus niger***, 2010. 158 f. Dissertação (Mestrado no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

WEBER, J. **APROVEITAMENTO DO RESÍDUO DE ÓLEO DE FRITURA PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE METIL E ETIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS**. 2013. 118 f. Tese (Doutorado Curso de Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - Sc, 2013.

WOLSKI, E. **Estudo Coparativo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium sp* livre e imobilizado**. 84f. Dissertação (Mestrado do Curso de Engenharia de Alimentos) URI Campus, Erechim, 2009.

ZILLI, J.E; RUMJANEK, N.G; XAVIRE, G,R; COUTINHO, H.LC; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, set.. 2003.

ZULLAIKAH, S; LAI, C.C; VALI, S.R; JU, Y,H. two-step acid-catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil. **Bioresource Techonology**. V.96, p. 1889-1896, 2005.

## CAPÍTULO II



ISSN: 1984-3151

## SELEÇÃO DE MEIOS DE PRODUÇÃO DE LIPASE POR AMOSTRAS DE *Aspergillus* sp ISOLADAS DA CAATINGA DE PERNAMBUCO

SELECTION OF MEDIA OF PRODUCTION LIPASE SAMPLES BY *Aspergillus* sp ISOLATED FROM CAATINGA IN PERNAMBUCO

Brindize Ferreira de Lima<sup>1</sup>, Henrique Siqueira Amorim<sup>2</sup>, Aline Elesbão do Nascimento<sup>3</sup>, Galba Maria de Campos Takaki<sup>4</sup>, Carlos Alberto Alves da Silva<sup>5</sup>

- 1 Mestranda em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. [brindizeflima@hotmail.com](mailto:brindizeflima@hotmail.com)
- 2 Iniciação Científica PIBIC-CNPq. Aluno de Engenharia Química, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. [henrique.siqueira.amorim@gmail.com](mailto:henrique.siqueira.amorim@gmail.com)
- 3 Doutora em Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. [elesbao@unicap.br](mailto:elesbao@unicap.br)
- 4 Doutora em Microbiologia Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. [takaki@unicap.br](mailto:takaki@unicap.br)
- 5 Doutor em Biotecnologia. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. [calves@unicap.br](mailto:calves@unicap.br)

Recebido em: XX/XX/XXXX - Aprovado em: XX/XX/XXXX - Disponibilizado em: XX/XX/XXXX

**RESUMO:** O setor de produção de enzimas microbianas tem crescido nas últimas décadas, motivado pela crescente utilização de enzimas nos diversos segmentos industriais. Novas iniciativas em pesquisa e desenvolvimento resultam na produção de diversos novos produtos e no aprimoramento dos processos e desempenho de produtos já existentes no mercado. Os fungos filamentosos compõem o grupo de microorganismos com maior número de espécies produtoras de compostos biotecnológicos utilizados em diversos ramos industriais e apresentam uma imensa variedade morfológica e um elevado potencial bioquímico e fisiológico. O gênero *Aspergillus* se destaca por apresentar um elevado potencial na produção de bioprodutos de alto valor agregado, principalmente em enzimas microbianas. A seleção adequada dos nutrientes na elaboração dos meios de produção de lipase envolve uma série de estudos prévios para introdução de substratos que quimicamente sejam constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, e possam produzir a enzima em maiores quantidades. A Caatinga é uma região pouco explorada biotecnologicamente, possuindo uma imensa população microbiana que apresenta um elevado potencial enzimático desconhecido. Foram realizados ensaios de seleção

utilizando 6 meios de produção diferentes para produção de lipase, utilizando as amostras denominadas SIS 10 e SIS 16 isoladas da Caatinga de Pernambuco. Os ensaios de produção ocorreram a 150 rpm, 28°C, durante 144 horas. Os resultados obtidos evidenciaram que o melhor meio testado foi o meio 4 com a amostra SIS 16, obtendo uma produção de 2,16 U/mg de lipase. O estudo da seleção de meios de produção de enzimas microbianas é um recurso necessário para obtenção de novos meios com elevado potencial de produção.

**PALAVRAS-CHAVE:** seleção de meios, *Aspergillus*, lipase fúngica.

**ABSTRACT:** In last decades the area of microbial enzymes production has grown as a function of the increasing use of enzymes in various industrial segments. New insights in the research and development result in the production of several new products and improve processes and performance of existing products on the market. Filamentous fungi are a group of microorganisms with a high number of species that produce biotechnological compounds used in various industries and present a high variety of morphological, biochemical and physiological potential. The *Aspergillus* genus exhibits a high potential for the production of high value-added bioproducts, especially enzymes. The selection of the nutrients for media related to lipase production involves a number of prerequisites for introducing substrates chemically consisting of long-chain fatty acid, and result in a high enzyme content. The Caatinga is a Biome little explored biotechnologically having an immense microbial population with a high and unknown potential for enzymes productivity. Screening studies were conducted using 6 different production media for lipase using isolates named SIS 10 and SIS 16 obtained from soil Caatinga of Pernambuco. The production trials occurred at 150 rpm, 28 °C, during 144 hours. The results showed that the isolate SIS 16 grown in medium 4 presented an activity of 2.16U/mg lipase. The study the culture media selection for microbial production of enzymes is a necessary tool for the new media composition with a high production potential

**KEYWORDS:** media selection, *Aspergillus*, fungal lipase

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de diferentes tipos de enzimas nas indústrias tem surgido como uma das possibilidades de tornarem os processos tecnológicos mais eficientes, com elevados rendimentos e sem causar grandes danos ao meio ambiente (HASAN et al., 2006; NIGAN, 2013). A demanda mundial de utilização dessas enzimas tem crescido anualmente, sendo mais de 90% do seu comércio efetuado pelos países como Estados Unidos, Europa e Japão. Existe uma expectativa de crescimento deste mercado e espera-se para os próximos anos, gastos superiores a 2,7 bilhões de dólares, com previsões futuras de aumento em torno de 4% (JOHANNES, ZHAO, 2006; IYER, ANANTHANARAYAN, 2008; DEMAINE, ADRIANO, 2008; LI et al., 2012; ADRIANO, DEMAINE, 2014).

As lipases (E.C.3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de gorduras e óleos, liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006; COLLA, REINEHR, COSTA,

2012), possuindo a capacidade de catalisar reações de esterificação, transesterificação e interesterificação em solventes orgânicos (VILLENEUVE et al., 2000; CARVALHO et al., 2000; SATOH et al., 2002; AKOH et al., 2004; BASSEGODA et al., 2010; STERGIOU et al., 2013). Esta classe de enzimas é produzida por animais, vegetais e diversos gêneros de microorganismos (POKORNY, FRIEDRICH, 1994; GUPTA et al., 2004; ZHAO et al., 2013), sendo definidas quimicamente como carboxilesterases, que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila constituída por mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos, são denominadas genericamente como esterases (THEIL, 1995; VERGER, 1997; REIS et al., 2009; GHALY et al., 2010; SCHRECK, GRUNDEN, 2013).

Esse grupo de enzimas possui diversas aplicações industriais, através de sua utilização na produção de alimentos, detergentes (hidrólise de gorduras),

cosméticos (remoção de lipídeos), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas). Também são utilizadas como biocatalisadores ideais em química orgânica, química fina (síntese de ésteres), indústria farmacêutica e na produção de aditivos alimentares (intensificação de aromas) (HOUDE et al., 2004; HASAN et al., 2006; TREICHEL et al., 2010; ANBU et al., 2013; LOU et al., 2013; CIRIMINNA, PAGLIARO, 2013; SHARMA, KANWAR, 2014).

As lipases microbianas são consideradas versáteis, pois apresentam uma série de vantagens em relação as lipases produzidas por células animais e vegetais (SETH, et al., 2014), que vão de um elevado rendimento de conversão do substrato em produto, grande versatilidade de adaptação às condições ambientais, e devido à sua capacidade de realizar reações de catálise em condições extremas de temperatura e pH e solventes orgânicos com quimio-, regio- e enantioseletividade (BERGLUND, 2001; MURALIDHAR et al., 2002; JAEGER, EGGERT, 2004; SHARMA, KANWAR, 2014).

A estrutura química e as características cinéticas das lipases microbianas produzidas variam dependendo do micro-organismo, gênero, espécie, e da composição do meio de produção utilizado (BENJAMIN, PANDEY, 2001; TAVARES et al., 2011, MASSADEH, SABRA, 2011; GARCIA-GALAN et al., 2013; FICKERS, NICAUD, 2013).

A seleção adequada dos nutrientes presentes na elaboração dos meios de produção de lipase envolve uma série de estudos prévios para introdução de substratos que quimicamente sejam constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes para que ocorra uma maior produção. Os substratos naturais utilizados na composição de meios de produção de lipases são óleos e gorduras

contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes, enquanto esterases atuam sobre um único tipo de ligação éster, liberando ácidos graxos de baixo peso molecular (BORNSCHEUER, KAZLAUSKAS, 2004; HULT, BERGLUND, 2007). Deve-se enfatizar que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; PANDA, GOWRISHANKAR, 2005; JEGANNATHAN, NIELSEN, 2013).

Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* se destacam como excelentes produtores de metabólitos secundários de interesse industrial e ambiental, pois apresentam uma elevada taxa de crescimento e uma grande termotolerância, o que favorece estudos de seleção e produção de bioprodutos de alto valor agregado (BERKA et al., 1992; WARD et al., 2005; LOTFY et al., 2007; MATA-GOMEZ et al., 2009; DHILLON et al., 2012; GOSWAMI et al., 2012; CHAVAN, DESHPANDE, 2013; MALDONATO, MACEDO, RODRIGUES, 2014).

Este trabalho teve por objetivo selecionar meios de produção de lipase utilizando amostras de *Aspergillus sp* isoladas da Caatinga de Pernambuco. A produção da enzima foi realizada através de fermentação submersa.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Micro-organismos

Foram utilizadas culturas de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus sp* isolados da Caatinga de Pernambuco denominados de SIS 10, 11, 14, 15 e 16 previamente catalogados no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), localizado no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB). As culturas

foram mantidas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), com a seguinte composição: dextrose (40 g/L), peptona (10 g/L), ágar (20 g/L), água destilada 1000 mL e pH 7,0.

## 2.2. Seleção de amostras produtoras de lipase

Foi utilizada a metodologia de Hankin, Anagnostakis (1975), utilizando o meio para a detecção da atividade lipolítica (g/L): Peptona(10g); Cloreto de sódio (5,0g) Cloreto de cálcio dihidratado (0,1 g) Ágar (20g) Tween 20 (0,1); água destilada (1000 mL); pH 6,0. O meio de cultura foi distribuído em placas de Petri, e após a solidificação foi feito um furo no centro das placas, cujo diâmetro foi de 0,8cm. Foram preparadas suspensões esporícas com as duas amostras (SIS 10 e SIS 16) e inoculados 100µL da suspensão nos poços. As placas foram incubadas em diferentes temperaturas (28°C, 37°C) durante 96 horas. O aparecimento de um halo claro em torno das colônias utilizadas evidenciava a presença da enzima. Todos os ensaios foram realizados e triplicata.

## 2.3. Pré inóculo

A contagem do número de esporos e células em suspensão foi realizada em câmara de Neubauer e microscópio binocular, utilizando volumes de 25 mL da suspensão quantificados no valor de  $10^7$  UFC/mL em meio caldo Sabouraud.

## 2.4. Seleção de meios de produção

Foram utilizados 6 meios de produção de lipase, com diferentes composições

**Meio 1 (g/L):** Glicose (0,1),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,2),  $K_2HPO_4$  (0,7), extrato de levedura (0,4), óleo de oliva (0,20), pH 6,5.

**Meio 2 (g/L) :** óleo de oliva (0,30), peptona (70),  $NaNO_3$  (1),  $KH_2PO_4$  (1),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,5), pH7,0;

**Meio 3 (g/L)::**  $NaNO_3$  (0,05),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,05), KCl (0,05),  $KH_2PO_4$  (0,2), extrato de levedura (0,1), peptona (0,5), óleo de oliva (0,1), pH 5,5.

**Meio 4 (g/L):** Glicose (0,25);  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,05);  $K_2HPO_4$  (0,175); Extrato de levedura (0,1); Óleo de Oliva (0,5); pH=7.

**Meio 5 (g/L):** Peptona (17,5);  $NaNO_3$  (0,25);  $KH_2PO_4$  (0,25);  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,125); Óleo de Oliva (7,5); pH=7.

**Meio 6 (g/L):**  $NaNO_3$  (0,0375);  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,0375); KCl (0,0375);  $KH_2PO_4$  (0,15); extrato de levedura (0,075); peptona (0,0375); Óleo de Oliva (0,25); pH=7.

A produção enzimática foi realizada em shaker orbital com Erlenmeyers de 500 mL, com volume útil de 250 mL (% p:v), 150 rpm, 28° C, durante 144 horas, com acompanhamento diário. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

## 2.5. Determinação da biomassa microbiana

A biomassa foi determinada após o termino dos ensaios dos meios de produção. A massa micelial foi filtrada em papel de filtro, previamente seca e pesada, o material retido foi transferido para estufa a 50°C, até secura total. Em seguida foram transferidos para o dessecador até peso constante. O sobrenadante foi utilizado para a determinação do pH e da atividade lipolítica.

## 2.6. Determinação do pH

Todas as amostras coletadas foram submetidas a leituras no potenciômetro para leitura do pH.

### 2.7. Determinação da atividade lipolítica

A atividade lipolítica das amostras fermentadas foi detectada através da metodologia descrita por SOARES et al. (1999). Foi realizada a reação de uma mistura contendo 5 mL de uma emulsão de óleo de oliva e goma arábica (7%), 2 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M), pH 7,0 e 1 mL do extrato bruto filtrado das amostras de lipase coletadas durante o processo de produção. A mistura foi agitada em shaker orbital a 82 rpm, 37 °C, durante 10 minutos.

A reação foi paralisada através da adição de 10 mL de uma mistura acetona-etanol-água (1:1:1), que irá liberar os ácidos graxos livres presentes na mistura. A mistura foi titulada uma solução de KOH (0,04 N) na presença do indicador fenolftaleína. Os ensaios foram realizados em triplicatas e a atividade enzimática foi determinada através da seguinte relação: uma unidade da atividade lipolítica (U/mL) será definida como a quantidade da enzima bruta que liberou 1 µ/mL de ácido graxo por minuto.

### 2.8. Cálculo da atividade enzimática

A atividade enzimática de lipase foi calculada através da equação seguinte equação:

$$AE \text{ (U/mL)} = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 1000}{t \times V_c} \quad (\text{equação 1})$$

Onde: AE é a atividade lipolítica (U/mL);

V<sub>a</sub> é o volume da amostra titulada (mL);

V<sub>b</sub> é o volume da amostra utilizado na reação (mL);

N é a molaridade da solução de KOH (N);

t é o tempo de reação em minutos,

V<sub>c</sub> é o volume da amostra utilizada na reação (mL).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados ensaios de detecção da atividade lipolítica em meio sólido com duas amostras isoladas

da Caatinga de Pernambuco (SIS 10, 11, 14, 15 e 16) através da metodologia de Hankin, Anagnostakis (1975). Os resultados obtidos estão descritos na tabela 1 e a formação do halo característico na figura 1.

Tabela 1 Atividade lipolítica dos isolados *Aspergillus sp* durante 96 horas de crescimento.

Micro-organismos <i>Aspergillus sp</i>	Índice enzimático	
	28° C (cm)	37° C (cm)
SIS 10	2,2	1,2
SIS 11	1,3	1,2
SIS 14	1,5	1,5
SIS 15	1,5	1,2
SIS 16	2,2	1,1

Os resultados obtidos indicaram que os micro-organismos denominados de SIS 10 e SIS 16, apresentaram um índice enzimático de 2,2 cm, respectivamente. A presença desses índices foi verificada no período de 96 horas, na temperatura de 28 °C. Nos mesmos ensaios com a temperatura de 37°C, as mesmas amostras apresentaram índices enzimáticos de 1,2 e 1,1 cm, respectivamente.

Na figura 1 estão demonstrados a ausência de formação do halo característico e a produção do mesmo. COLEN, 2006 descreve que alguns micro-organismos crescem em temperaturas entre 25-37°C, e produzem metabólitos de interesse biotecnológico. SOARES et, al.2010, descreveram que utilizando linhagens de *Aspergillus sp*, demonstraram valores enzimático < 2,0, relatando que esses valores indicam um baixo potencial enzimático, considerando que um micro-organismo bom produtor de enzimas extracelulares são classificados com índice enzimático ≥ 2,0.

Os fungos filamentosos compõem o grupo microbiano com um elevado número de espécies descritas na literatura e apresentam imensa variedade morfológica e elevado potencial bioquímico e fisiológico. Treichel et al., 2010 descrevem que o gênero *Aspergillus* se destaca por apresentar um elevado potencial biotecnológico na produção de bioprodutos de alto valor agregado, principalmente as enzimas microbianas.

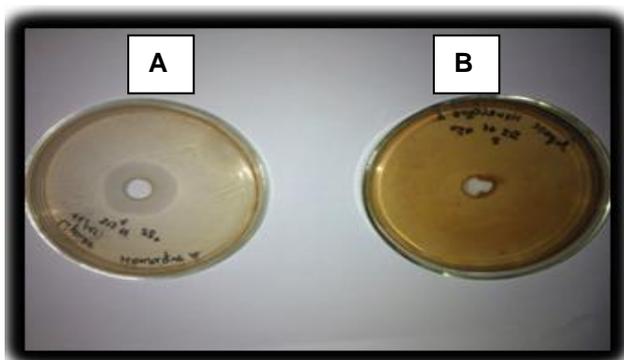


Figura 1. Detecção de lipase: (A) formação de halo lipolítico, (B) ausência de formação de halo lipolítico.

Após a seleção das amostras nos testes em meio sólido, foi evidenciada que os micro-organismos SIS 10 e 16 apresentaram halos de produção superiores às outras amostras testadas.

Em seguida foram seis fermentações consecutivas, utilizando meios de produção de lipase descritos na literatura. A seleção mais adequada dos nutrientes presentes na elaboração dos meios de produção de lipase envolve uma série de estudos prévios para introdução de substratos que quimicamente sejam constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes para que ocorra uma maior produção da enzima.

A tabela 2 contém os valores obtidos da produção lipolítica em diferentes meios testados para a amostra SIS 10. O óleo de oliva foi utilizado como principal

indutor para a produção da atividade lipolítica, influenciando a produção da enzima, pois a interação com os reagentes adicionados utilizados na composição do meio com o micro-organismo produziu a quebra das ligações das cadeias de ácidos graxos presentes favorecendo a produção da enzima.

Orlandelli et al., 2012 descreveu que a presença de elementos minerais (fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro e cloro) e uma pequena quantidade de elementos traços que desempenham importante papel como constituintes de enzimas e coenzimas (manganês, cobre, zinco, molibdênio, cromo, níquel, cobalto e boro) são geralmente necessários nos meios de produção de enzimas por micro-organismos.

Verifica-se na tabela 2 que a maior produção da enzima foi obtida após 144 horas no meio 4, apresentando uma atividade de 1,640 U/mL. O meio 3 foi o que apresentou os menores resultados de produção da enzima.

Tabela 2 – Atividade lipolítica nos meios de produção em 144 horas a 28°C por *Aspergillus sp* (SIS 10).

Tempo (h)	Meio1 (U/mL)	Meio2 (U/mL)	Meio3 (U/mL)	Meio4 (U/mL)	Meio5 (U/mL)	Meio6 (U/mL)
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	0,0	0,53	0,0	1,246	0,266	0,03
48	0,026	0,69	0,0	1,45	0,68	0,78
72	0,10	1,06	0,0	1,58	0,466	0,206
96	0,252	1,22	0,22	1,71	0,58	0,4
120	0,232	1,33	0,10	1,38	0,54	0,54
144	0,120	1,17	0,10	1,640	0,346	0,32

Verifica-se na tabela 2 que a maior produção da enzima foi obtida após 144 horas no meio 4, apresentando uma atividade de 1,640 U/mL. O meio 3 foi o que apresentou os menores resultados de produção enzimática.

Na tabela 3 encontram-se os valores obtidos da produção lipolítica em diferentes meios testados para a amostra SIS 16. Verifica-se os meios 1 e 3 apresentaram resultados considerados como não satisfatórios para o micro-organismos testado.

Tabela 3 – Atividade lipolítica nos meios de produção em 144 horas a 28°C por *Aspergillus sp* (SIS 16).

Tempo (h)	Meio1 (U/mL)	Meio2 (U/mL)	Meio3 (U/mL)	Meio4 (U/mL)	Meio5 (U/mL)	Meio6 (U/mL)
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	0,0	0,586	0,0	1,352	0,32	0,066
48	0,0	0,64	0,0	1,404	0,37	0,32
72	0,0	1,292	0,0	1,666	0,28	0,28
96	0,272	1,34	0,18	1,492	0,505	0,506
120	0,166	1,06	0,146	1,90	0,65	0,65
144	0,14	1,52	0,112	2,16	0,36	0,36

Falony et, al. 2006 descreveram que amostras de *Aspergillus niger*, na presença de fontes de nitrogênio em meios de produção, influenciam os níveis de adição de fontes de carbono. A junção de fontes de carbono no meio (glicose e óleo de oliva) otimizam a produção da atividade lipolítica.

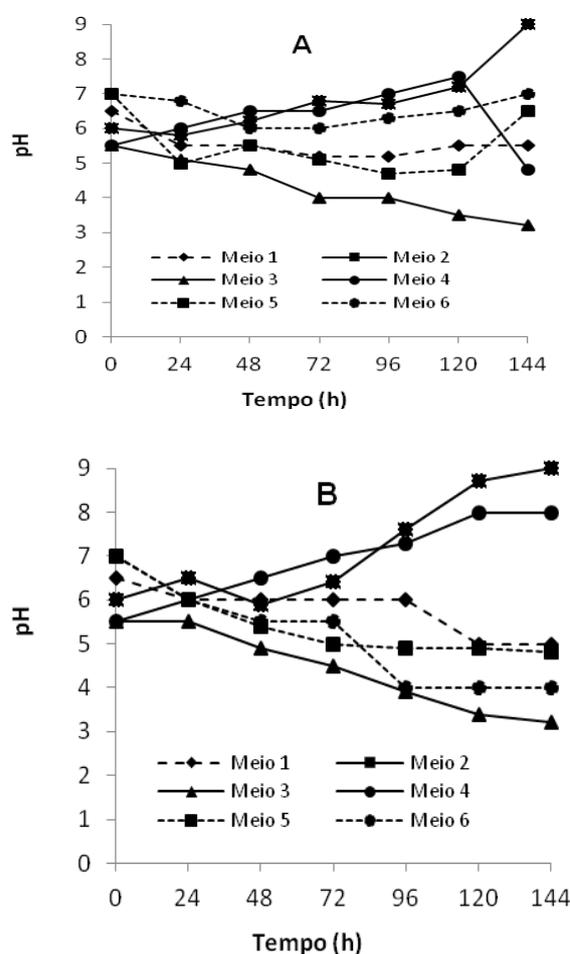
Verifica-se que a maior atividade da enzima produzida, ocorreu no meio denominado 4, com 144 horas de produção, obtendo um valor de 2,16 U/mL.

Colla, Reinehr, Costa (2012) descreveram que a produção de enzimas microbianas por fungos filamentosos são especialmente valorizadas biotecnologicamente, o que facilita sua recuperação em meio de produção e descrevem que o gênero *Aspergillus* como um dos bons produtores de lipase.

Com relação à determinação do pH das amostras nos ensaios testados, verificou-se que as maiores variações ocorreram nos meios 2, 3 e 5 com as duas amostras testadas descritas nas figuras 2 (A e B).

Na Figura 2A encontram-se os valores de pH obtidos nos seis meios testados para a amostra denominada de SIS 10. Verifica-se que o valor pH inicial do meio 2 foi de 6,0 e após 144 horas, atingiu valor de 9,0, ficando na faixa alcalina. O meio 4 considerado o que apresentou a maior atividade lipolítica obtida, iniciou os ensaios de produção com o pH 7,0 e após 144 horas obteve valores de na faixa alcalina.

Figura 2. Determinação do pH nos meios de produção por *Aspergillus sp* SIS 10 (A) e SIS 16 (B) em 144 horas a 28°C.



Na Figura 2B encontram-se os valores de pH obtidos nos seis meios testados para a amostra denominada de SIS 16. Os ensaios realizados no meio 3 cujo valor inicial era de 5,5 e após 144h, atingiu valor de 3,2, atingindo a faixa ácida e no ensaio 5, o pH inicial foi de 7,0, tendo atingindo valor final de 4,8. O meio 4

apresentou um comportamento estável se mantendo na faixa neutra.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A grande potencialidade das aplicações das lipases nos diferentes ramos industriais, principalmente devido às características diferenciadas apresentadas pelos diversos micro-organismos produtores, justifica a procura por novas amostras produtoras dessa enzima, principalmente de ambientes ainda pouco estudados, como a região da Caatinga.

Destaca-se a habilidade da amostra isolada *Aspergillus sp* (SIS 16) em hidrolisar os ácidos graxos presentes na composição dos meios estudados,

através da quebra das ligações ésteres tríplices transformando-os na enzima estudada.

Esses estudos de produção lipolítica revelam o elevado potencial biotecnológicos dos fungos isolados do solo da Caatinga do Estado de Pernambuco.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Projeto SISBIOTA - CnPq, FACEPE pelo suporte financeiro para realização desse trabalho, e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pela infra-estrutura para execução de toda parte experimental.

---

#### REFERÊNCIAS

- ADRIO, J.L., DEMAINE, A.L. Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, n.4, p.117-139, 2014.
- AKOH, C.C., LEE, G.C., LIAW, Y.C., HUANG, T.H., SHAW, J.F. GDSL family of serine esterases/lipases. **Progress in Lipid Research**, v.43, n.6, p. 534-552, 2004.
- ANBU, P., GOPINATH, S.C.B., CIHAN, A.C., CHAULAGAIN, B.P. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine. **BioMed Research International**, 2 páginas, ID 204014, 2013.
- ANDUALEMA, A., GENESSESSE, A. Microbial lipases and their industrial applications: review. **Biotechnology**, v.11, n.3, p.100-118, 2012.
- BASSEGODA, A., CESARINI, S., DIAZ, P. Lipase improvement: goals and strategies. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.2, n.3, 8p., 2012.
- BENJAMIN, S., PANDEY, A. Optimization of liquid media for lipase production by *Candida rugosa*. **Bioresource technology**. V.55, p.167-170, 1996.
- BENJAMIN, S., PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 2, p213–221, 2001.
- BERGLUND, P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. **Biomolecular Engineering**, v.18, n.1, p.13-22, 2001.
- BERKA, R.M., DUNN-COLEMAN, N., WARD, M. Industrial enzymes from *Aspergillus* species. **Biotechnology**, v.23, p.155-202, 1992.
- BORNSCHEUER, U.T., KAZLAUSKAS, R.J. Catalytic promiscuity in biocatalysis: using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. **Chem. Int. Ed.** 43, 6032–6040, 2004.
- BORNSCHEUER, U.T., BESSLER, C., SRINIVAS, R., KRISHNA, S.H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in biotechnology**, v.20, n.10, p.433-437, 2002.
- CARVALHO, C.M.L.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Kinetic of cutinase catalyzed transesterification in AOT reversed micelles: modeling of a batch stirred tank reactor. **J. Biotechnol.**, v. 81, p.1-13, 2000.
- CHAVAN, S.B., DESHPANDE, M.V. Chitinolytic enzymes: An appraisal as a product of commercial potential. **Biotechnology Progress**, v.29, n.4, p. 833-846, 2013.
- CIRIMINNA, R., PAGLIARO, M. Green Chemistry in the Fine Chemicals and Pharmaceutical Industries. **Organic Process Research & Development**, v. 17, n. 12, p. 1479-1484, 2013.

- COLLA, L.M., REINEHR, C.O., COSTA, J.A.V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista de ciências exatas aplicadas e tecnológicas**, v.4, n.2. p.1-14, 2012.
- DEMAIN, A.L., ADRIO, J.L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Mol. Biotechnol.**, v.38, p.41-45, 2008.
- DHILLON, G.S., SATINDER K. BRAR, S.K., VERMA, M. Biotechnological potential of industrial wastes for economical citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* through submerged fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, p.542–548, 2012.
- FALONNI, G. et al., Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* solid state fermentation. **Food Techn. Biotech.** v. 32, n.6, p. 235-240, 2006.
- FICKERS, P., NICAUD, J.M. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica* lipases: An overview. **Microbiology Monographs**, v.25, p. 121-136, 2013.
- GHALY, A.E.; DAVE, D.; BROOKS, M.S., BUDGE, S. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v.6, n. 2, p.54-76, 2010.
- GARCIA-GALAN, C., BARBOSA, O., ORTIZ, C., TORRES, R., RODRIGUES, R.C., FERNANDEZ-LAFLUENTE, R. Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*. **Journal of Molecular Catalysis B; Enzymatic**, v.93, p.34-43, 2013.
- GOCHEV, V., MONTERO, G., KOSTOV, G., TOSCANO, L., STOYTICHEVA, M., KRASTANOV, A., GEORGIEVA, A. Nutritive medium engineering enhanced production of extracellular lipase by *Trichoderma longibrachiatum*. **Biotechnological & biotechnological equipment**. v.26, p.2875-2882, 2012.
- GOSWAMI, S., RANI, A., PRIYADARSHINI, R., BHUNIA, B., MANDAL, T. A review on production of echinocandins by *Aspergillus sp.* **J. Biochem Tech.** v.4, n.1, p.568-575, 2012.
- GHOSH, P.K., SAXENA, R.K., GUPTA, R., YADAV, R.P., DAVIDSON, S. Microbial lipases: production and applications. **Science progress**, v.79, n.2, p.119-157, 1996.
- GOPINATH, S.C.B., ANBU, P., LAKSHMIPRIYA, T., HILDA, A. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. **BioMed research international**, ID154549, p.1-10, 2013.
- GUPTA, R., GUPTA, N., RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.64, p.763-781, 2004.
- GUNASEKARAN, V., DAS, D. Lipase fermentation: progress and prospects. **Indian journal of biotechnology**. v.4, p.437-445, 2005.
- HARI, G.D., RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource technology**, v.89, p.17-34, 2003.
- HASAN, F., SHAH, A.A., HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology advances**. v. 27, p.782-798, 2009.
- HASAN, F., SHAH, A.A., HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and microbial technology**, v.39, p.235-251, 2006.
- HOUDE, A., KADEMI, A., LEBLANC, D.. Lipases and their industrial applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.
- HULT, K., BERGLUND, P. Engineered enzymes for improved organic synthesis. **Curr. Opin. Biotechnol.** 14, 395–400, 2007.
- HULT, K., BERGLUND, P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. **Trends in Biotechnology**, v.25, n.5, p. 231-238, 2007.
- IYER, P.V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization —Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v.43, p. 1019-1032, 2008.
- JAEGER, K.L., EGGERT, T. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, n.4, p. 305-313, 2004.
- JAEGER, K.L., EGGERT, T. Lipases for biotechnology, **Current Opinion in biotechnology**, v.13, p.390-397, 2002.
- JEGANNATHAN, K.R., NIELSEN, P.H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production - a literature review. **Journal of Cleaner Production**, n. 42, p.228-240, 2013.
- JOHANNES, T.W., ZHAO, H. Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. **Current Opinion of Microbiology**, v.9, p. 261-267, 2006.
- LI, S., YANG, X., YANG, S., ZHU, M., WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Comput. Struct. Biotechnol. J.**, v. 2, p. 1-11, 2012.
- LIMA, V.M.G., KRIEGER, N., SARQUIS, M.I.M., MITCHELL, D.A., RAMOS, L.P., FONTANA, J.D.

- Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food technology and biotechnology**, v.41, n.2, p. 105-110, 2003.
- LOTFY, W.A., GHANEM, K.M., EL-HELOW, E.R. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. **Bioresource Technology**, v.98, n.18, p. 3464-3469, 2007.
- LOU, L., HAO, C., YIFENG, T., BIQIANG, C. Recent advances in industrial applications of lipases and strategies for improving lipase properties. **Journal of Bioprocess Engineering and Biorefinery**, v.2, n.2, p.117-124, 2013.
- MALA, J.G.S., KAMINI, N.R., PUVANAKRISHNAN, R. Strain improvement of *Aspergillus niger* for enhanced lipase production. **Journal of general and applied microbiology**, v.47, p.181-186, 2001.
- MALDONATO, R.R., MACEDO, G.A., RODRIGUES, M.I. Lipase Production Using Microorganisms from Different Agro-Industrial By-Products. **International Journal of Applied Science and Technology**, v.4, n.1, p. 108-115, 2014.
- MASSADEH, M.I., SABRA, F.M. Production and characterization of lipase from *Bacillus stearothermophilus*. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.61, p.13139 -13146, 2011.
- MATA-GOMEZ, M.; RODRIGUEZ, L.V.; RAMOS, E. L.; RENOVATO, J.; CRUZ-HERNADEZ, M.A.; RODRIGUEZ, R.; CONTRERAS, J. AGUILAR, C.N. A Novel tannase from the xerophilic fungus *Aspergillus niger* GH1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.9, p.987-996, 2009.
- MESSIAS, J.M., COSTA, B.Z., GOMES DE LIMA, V.M., GIESE, E.C., DEKKER, R.F.H., BARBOSA, A.M. Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina : Ciências exatas e tecnológicas**, v.32, n.2, p.213-234, 2011.
- MURALIDHAR, R.V., CHIRUMAMILLA, R.R., MARCHANT, R., RAMACHANDRAN, V.N., WARD, O.P., NIGAM, P. Understanding lipase stereoselectivity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, n.2, p.81-97, 2002.
- NAGAR, M., DWIVEDI, S.K., SHRIVASTAVA, D. A review on industrial application in microbial lipases. **International journal of pharmaceutical & research sciences**, v.2, n.4, p.631-641, 2013.
- NIGAM, P.S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications, **Biomolecules**, v.3, p.597-611, 2013.
- ORLANDELLI, R.C. et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p. 97-109, 2012.
- PAHOJA, V.M., SETHAR, M.A. A review of enzymatic properties of lipase in plants, animals and microorganisms. **Pakistan journal of applied sciences**. v.2, n.4, p.474-484, 2002.
- PANDA, T., GOWRISHANKAR, B.S. Production and applications of esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, n.2, p.160-169, 2005.
- POKORNY, D., FRIEDRICH, J., CIMERMAN, A. Effect of nutritional on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v.16, n.4, p.363-366, 1994.
- RAY, A. Application of lipase in industry. **Asian Journal of Pharmacy and Technology**. V.2, n.2, p.33-37, 2012.
- REIS, P., HOLMBERG, K., WATZKE, H., LESER, M.E., MILLER, R. Lipases at interfaces: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-148, p.237-250, 2009.
- REKHA, K.S.S., CHANDANA LAKSHMI, M.V.V., SRIDEVI, V., MANASA, M. An overview of microbial lipases. **Journal of chemical, biological and physical sciences**. v.2, n.3, p.1379-1389, 2012.
- SALIHU, A., ALAM, M.Z. Production and applications of microbial lipases: a review. **Scientific research and essays**, v.7, n.30, p.2667-2677, 2012.
- SAMSON, R.A., VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical mycology**, v.47, suplemento 1, p. S13-S20, 2009.
- SATOH, T., TAYLOR, P., BOSRON, W.F., SANGHANI, S., HOSOKAWA, M., DU, B.N. Current progress on esterases: from molecular structure to function. **Drug metabolism and Disposition**, v.30, n.5, p.488-493, 2002.
- SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology advances**, v.19, p.627-662, 2001.
- SHARMA, S., KANWAR, S.S. Organic solvent tolerant lipases and applications. **The Scientific World Journal**. ID 625258, 15 páginas, 2014.
- SCHRECK, S.D., GRUNDEN, A.M. Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 1846-1859, 2013.
- SETH, S., CHAKRAVORTY, D., DUBEY, V.K., PATRA, S. An insight into plant lipase research-challenges encountered, **Protein Expression and Purification**, v.95, p.13-21, 2014.

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

SOARES, C.M.F. et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore sílica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.79, n.77, p.745-757, 1999.

STERGIOU, P.Y., FOUKIS, A., FILIPPOU, M., KOUKOURITAKI, M., PARAPOULI, M., THEODOROU, L.G., HATZILOUKAS, E., AFENDRA, A., PANDEY, A., PAPAMICHAEL, E.M. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v.31, n.8, p.1846-1859, 2013.

TAVARES, L.L.P., NASCIMENTO, A.E., OKADA, K., ALVES DA SILVA, C.A. Seleção de diferentes meios para produção de lipase a partir de *Bacillus licheniformis* (UCP 1014). **Revista Exacta**, v.9, n.3, p.157-165, 2011.

THAKUR, S. Lipases, its sources, properties and applications: a review. **International Journal of Scientific & Engineering Research**. V.3, n.7, p.1-40, 2012.

THEIL, F. Lipase-supported synthesis of biologically active compounds, **Chemical Reviews**, v. 95, n.6, p. 2203–2227, 1995.

TREICHEL, H., OLIVEIRA, D., MAZUTTI, M.A., DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, J.V. A review on microbial lipases production. **Food and bioprocess technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artefacts. **Trends in Biotechnology**, v.15, n. 1, p. 32-38, 1997.

VILLENEUVE P., MUDERHWA J.M., GRAILLE J., HAAS M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

WARD, O.P., QIN, W.M., DHANJOON, J., YE, J., SINGH, A. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. **Advances in Applied Microbiology**, v.58, p.1-75, 2005.

ZHAO, P., YUAN, Y., WANG, Y., ZHANG, Y. LI, J. Screening and identification of a novel lipase producing *Aspergillus niger* Yz15 and optimization for lipase production. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, n.5, n.12, p. 418-424, 2013.

### **CAPÍTULO III**

Artigo: A ser submetido à Revista Engevista

INSS: 1415-7314 e ISSN: 2317-6717

## INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE LIPASE POR *ASPERGILLUS SP* ATRAVÉS DE UM PLANEJAMENTO FATORIAL.

Brindize Ferreira de Lima<sup>1</sup>,  
Marcos Antonio Cavalcanti Luna<sup>2</sup>  
Grayce Kelli Barbosa da Silva<sup>3</sup>  
Cláudia Maria Rocha Moura,<sup>4</sup>  
Jupiranan Ferreira da Silva<sup>5</sup>  
Galba Maria de Campos Takaki<sup>6</sup>  
Carlos Alberto Alves da Silva<sup>7</sup>

1- Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais; 2- Doutorado em Ciências Biológicas; 3- Doutorado em Ciências Biológicas; 4- Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais; 5 Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais; 6- Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) ; 7- Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) – R. do Príncipe, 526, Boa Vista, Recife, Pernambuco, 50050-900.

### Resumo:

A grande expansão agroindustrial, paralela à utilização dos recursos ambientais tem mobilizado vários segmentos da sociedade para a correta gestão ambiental destes, e assim tem-se aplicado políticas ambientais, a fim de diminuir impactos negativos a natureza.

As lipases são enzimas largamente distribuídas na natureza, que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Estas enzimas, encontradas em tecidos animais, vegetais e em microrganismos, têm papel fundamental no metabolismo de lipídios destes seres vivos. Fungos filamentosos do gênero *aspergillus* sp são micro-organismos interessantes ao meio ambiente, São considerados importantes agentes decompositores e encontrados em abundancia nos solos, além de se apresentarem como um bom produtor de lipase extracelular. Neste trabalho foi avaliado a influência de resíduos agroindustriais para a produção de lipase. Com a utilização de um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> foi possível à escolha de uma melhor condição para a utilização desses substratos. Os resíduos adicionados ao meio de cultura foram farelo de trigo, farelo de arroz e óleo de fritura. Ensaios foram realizados por 192 horas em meio líquido a 28°C. Os resultados mostraram que todos os resíduos responderam significativamente para a atividade lipolítica, sendo que o óleo de fritura obteve uma atividade enzimática superior aos demais, 276(U/mL) em 192 horas.

Palavras Chaves: Lipase, *Aspergillus*, Resíduos Agroindustriais.

## Abstract

The large agro-industrial expansion, parallel to the use of environmental resources has mobilized various segments of society to correct environmental management of these, and so has implemented environmental policies in order to reduce negative impacts on nature. Lipase enzymes are widely distributed in nature, which catalyze the hydrolysis of fats and oils releasing free fatty acids, diacylglycerols, monoacylglycerols and glycerol. These enzymes, found in animal tissues, plants and micro-organisms, play a fundamental role in lipid metabolism of these living beings. Filamentous fungi of the genus *Aspergillus* sp are interesting environmental micro-organisms, important decomposers agents are considered and found in abundance in soils, and stand as a good producer of extracellular lipase. This study evaluated the influence of agro-industrial wastes for the production of lipase. With the use of a 23 factorial design was possible to choose a better condition for the use of these substrates. The residues added to the culture medium were wheat bran, rice bran and oil bath. Assays were performed by 192 hours in liquid medium at 28 ° C. The results showed that all waste responded significantly to the lipase activity, and the frying oil had a higher enzymatic activity to the other, 276 (U / mL) in 192 hours.

Keywords: Lipase, *Aspergillus*, Agroindustrial Waster.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção em grande quantidade de resíduos industriais e agroindustriais apresentam uma elevada geração de resíduos muitas vezes com problemas de disposição final e com alto potencial poluente. Nos últimos anos, há um interesse crescente no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais. Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes materiais como substrato para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (ALEXANDRINO et al., 2007; TEIXEIRA et al. 2011).

Atualmente, as alternativas de valorização de resíduos através do aproveitamento em diversas atividades tem sido muito incentivadas, já que podem contribuir positivamente para a minimização da poluição ambiental, bem como diminuir os custos de produção e permitir a valorização econômica desses

resíduos (FERNANDES et al., 2008; MENEZES et al., 2012).

A grande expansão agroindustrial, paralela à utilização dos recursos ambientais tem mobilizado vários segmentos da sociedade para a correta gestão ambiental destes, e assim tem-se aplicado políticas ambientais, a fim de diminuir impactos negativos a natureza. Constantes revisões têm ocorrido nas resoluções ligadas a resíduos, tais como o Plano Nacional de Resíduos Sólidos e o CONAMA que classificam e propõem metas de redução, reutilização e reciclagem. Enfim, o século 21 está preocupado principalmente como o meio ambiente e a sustentabilidade do planeta (PELIZER et al., 2007; SCHNEIDER et al., 2012)

O uso de tecnologias enzimáticas é uma ferramenta promissora para síntese de compostos de alto valor agregado. Dentre as diversas enzimas utilizadas industrialmente, as lipases tem despertado interesse por apresentarem

capacidade de catalisar reações em meios orgânicos e aquosos, ou seja, em meios que apresentam condições restritas de água (FERNANDES, 2007; SBARDELOTTO et al., 2013).

A ampla gama de reações catalisadas confere às lipases um grande potencial biotecnológico. Possuem aplicações na indústria farmacêutica, química, alimentícia, médica, oleoquímica, na produção de polímeros biodegradáveis, biodegradação de petróleo, produção de biodiesel, biorremediação e no tratamento de resíduos e esgotos (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006; MAGRI et al., 2013).

As lipases podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana, sendo as últimas as mais utilizadas. Dentre as enzimas microbianas, as produzidas por fungos são especialmente valorizadas por serem extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de cultivo. (CARVALHO et al., 2013; COLLA, REINEHR, COSTA, 2012).

Atributos como a alta conversão de substrato em produto, facilidade de manipulação genética, rápido crescimento do micro-organismo produtor, utilização de meios de cultivos baratos e finalmente, produção de enzimas extracelulares de fácil obtenção tornam as lipases microbianas ainda mais interessantes para aplicações industriais (HORCHANI et al., 2009; ABREU, 2013).

O *Aspergillus* é um dos gêneros de fungos economicamente mais importantes, muitos isolados são utilizados na produção de diversos produtos. As espécies pertencentes a esse gênero ficaram cada vez mais conhecidas e passou a ser um dos grandes gêneros de fungos estudados devido a sua grande capacidade de fermentação e altos níveis de produção enzimática, principalmente aquelas utilizadas na hidrólise de polissacarídeos da parede celular das

plantas e na indústria de alimentos (LOPES, 2011; GUIMARÃES et al., 2006; MONTEIRO, 2012; GOTTSCHALK et al., 2013).

Outras características desse gênero são interessantes ao meio ambiente, o potencial desses fungos em produzir enzimas do tipo esterases e atuar na biodegradação de compostos ricos em ligações de ésteres, como polímeros, solventes, produtos médicos e pesticidas em solos contaminados (SUBHASH, MOHAN, 2011; OLIVEIRA, 2013).

Estudos realizados por SANTOS, LINARDI, 2004, SILVA, RONDON, 2013 utilizaram fungos dos gêneros *Aspergillus*, para biodegradação de compostos fenólicos, pois são capazes de degradar compostos aromáticos em seu metabolismo por meio de enzimas catabólicas celulases, lacases, proteases e fenol-hidroxilases.

A espécie *Aspergillus sp*, apresenta-se como um bom produtor de lipase extracelular por ter capacidade de fermentar uma grande variedade de matérias primas, são considerados importantes agentes decompositores de materiais lignocelulolíticos e encontrados em abundância nos solos. Estes grupos de micro-organismos não representam um grupo predominante no solo, e sua ocorrência está condicionada a fatores como pH, umidade e quantidade de matéria orgânica (ZILLI, 2003; MACIEL, 2006; WEINGARTNER, 2010; BARROS, 2012).

O presente trabalho investigou a influência das variáveis no planejamento fatorial  $2^3$  no meio de cultura para a produção de lipase sob a melhor condição para a utilização dos resíduos agroindustriais farelo de trigo, farelo de arroz e óleo de fritura, utilizando o fungo filamentoso *aspergillus sp* SIS 16 avaliando o potencial enzimático dos

mesmo, para fins biotecnológicos industriais futuros.

## 2. MATERIAL E MÉTODO

### Micro- organismo

A amostra de *Aspergillus* sp SIS 16, isolada da Caatinga de Pernambuco, previamente catalogada no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), localizado no Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB). Mantida em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), aclimatado com 5mL de oliva a temperatura de 28°C, foi utilizada para a produção de lipase.

### Inóculo

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL, com volume útil de 250 mL (%p:v). Alíquotas de 25mL de uma suspensão esporíca  $10^7$  foram adicionadas em meio de cultura contendo (g/L)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,3);  $KH_2PO_4$ (0,5);  $(NH_4)_2HPO_4$ (10,0);  $NaH_2PO_4$ (12,0);  $CaCl_2$  (0,25);  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (5,0);  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,015);  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,03); Óleo de oliva (0,5%); pH= 5,5. As amostras coletadas no processo de incubação foram submetidas à determinação do pH, Cinética de crescimento e Atividade lipolítica expressa em (U/mL). Os ensaios fermentados foram realizados em triplicatas de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ , por 144 á 28 °C.

### Produção de Lipase com meio controle e com meios alternativos.

Os ensaios utilizando os resíduos agroindustriais de farelo de trigo, farelo de arroz e óleo de fritura (Figuras 1. A-B-C) em substituição ao óleo de oliva foram realizados para avaliar a influência da fonte de carbono na produção da enzima, para isto, utilizou-se a melhor condição do planejamento fatorial  $2^3$ . Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 500 mL, em um volume útil de 250 mL(%p:v). As concentrações dos resíduos utilizadas para os ensaios foram de 7g de farelo de trigo, 7g de farelo de arroz e 7mL do óleo de fritura e para o meio controle 7mL do óleo de oliva. Os ensaios foram realizados em cultivos submersos (Figura 2) a 86 rpm, durante 192 horas a 28°C. As alíquotas coletadas nos intervalos de 24h de cultivos serviram para análise da produção de biomassa, pH e atividade lipolítica expressa em (U/mL). De acordo com a metodologia descrita por SOARES et al., (1999). Todos os ensaios foram em triplicata.

Figura 1. Resíduos agroindustriais utilizados para estudos da produção de lipase. Resíduo **A**, Farelo de trigo, Resíduo **B**, Farelo de arroz, Resíduo **C** Óleo de fritura. Utilizados para análise lipolítica da enzima.

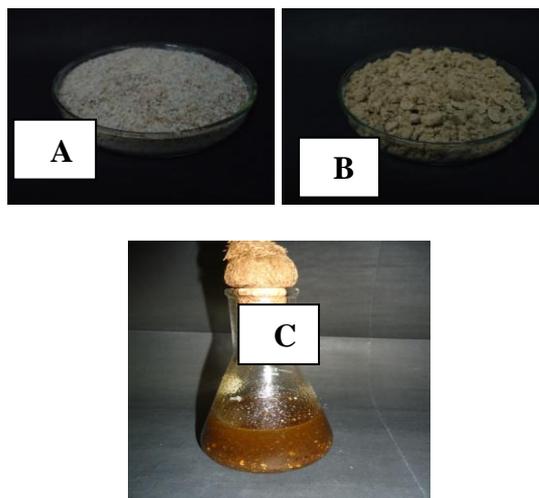
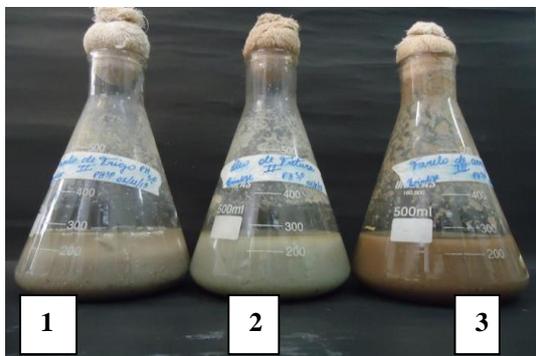


Figura 2. Resíduos agroindustriais de Farelo de trigo **1**, Óleo de fritura **2** e Farelo de arroz **3** em fermentação submersa.



## PLANEJAMENTO FATORIAL

Um planejamento experimental  $2^3$  foi realizado para analisar os efeitos principais e interações das variáveis concentrações de pH, Óleo de Oliva e Fonte de Nitrogênio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) com 4 pontos centrais e níveis +1 e -1, (Tabela 1) com apoio de um Software Estatística 7.0 da Stat Soft. (Tabela 1)

Tabela 1. Valores dos Fatores utilizados no Planejamento Fatorial  $2^3$

Variáveis	-1	0	+1
pH	5,0	7,0	9,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (g/L)	1,0	3,0	5,0
Óleo de Oliva (mL)	3,0	5,0	7,0

## DETECÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Através da metodologia descrita por SOARES et al (1999), foi realizada a atividade lipolítica das amostras. O substrato contendo óleo de oliva, emulsionado com goma arábica (7%) na

proporção 50:50. A reação enzimática composta de 5mL de substrato, 2 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M) pH 7,0 e 1 mL do extrato bruto filtrado da lipase produzida na encubação em meio líquido. A temperatura foi mantida em 37 °C, agitada em shaker orbital a 86 rpm, durante 10 minutos. A reação foi interrompida através da adição de 10 mL de uma mistura de acetona-etanol-água (1:1:1), os ácidos graxos livres presentes na mistura foram titulados com uma solução padronizada de KOH (0,04 N) utilizando fenolftaleína como indicador. A atividade enzimática foi determinada através da seguinte relação: uma unidade da atividade lipolítica (U/mL) será definida como a quantidade da enzima bruta que liberou 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto, foram detectadas as atividades lipolíticas nos meios controle e alternativos. A atividade enzimática foi calculada através da seguinte equação:

$$AE \text{ (U/mL)} = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 1000}{t \times V_c}$$

ONDE:

**AE** é a atividade lipolítica (U/mL);  
**V<sub>a</sub>** é o volume da amostra titulada (mL);  
**V<sub>b</sub>** é o volume da amostra utilizado na reação (mL);  
**N** é a normalidade da solução de KOH (mol/L);  
**T** é o tempo de reação em minutos;  
**V<sub>c</sub>** é o volume da amostra utilizada na reação (mL).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 2 descreve a máxima atividade lipolítica evidenciada nos ensaios realizados no planejamento fatorial  $2^3$  nas 144 horas em meio líquido. Ressaltando que nesta mesma tabela também observa-se que a maior atividade lipolítica ocorreu

no ensaio 7, que foi superior aos demais atingindo uma atividade lipolítica máxima de 101,2 U/mL. Neste estudo a variação da faixa do pH dos ensaios ocorreu de 3,1 a 8,2, modificado a faixa inicial utilizada. A atividade lipolítica máxima ocorreu quando o pH apresentava-se na faixa de 4,2.

A literatura reporta que espécies como *Aspergillus* crescem em uma faixa de pH que vai de 2,0 a 11,0. Entretanto o mesmo autor reporta que quando o pH afasta-se do ótimo (geralmente próximo a 5,0), a velocidade de seu crescimento diminui (RITTER,2007; MACEDO, 2009).

Tabela 2. Produção de biomassa, pH e atividade lipolítica dos ensaios para as concentrações de pH, Óleo de Oliva e Fonte de Nitrogênio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) em 144 horas de cultivo a 28°C a 86 rpm.

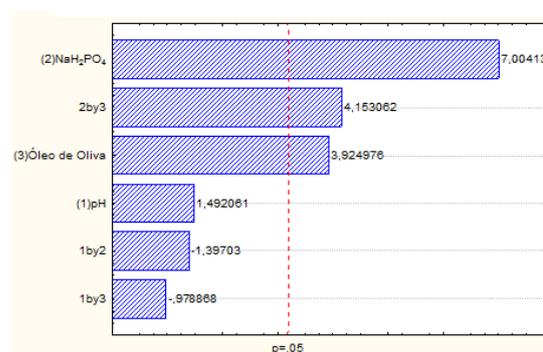
Ensaio	Variáveis descodificadas			Variáveis respostas		
	pH	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (g/L)	Óleo de Oliva (mL)	Biomassa (g/L)	pH	Lipase (U/mL)
1	5,0	1,0	3,0	1,28	3,1	60,0
2	9,0	1,0	3,0	1,45	8,2	72,0
3	5,0	5,0	3,0	1,34	3,2	70,0
4	9,0	5,0	3,0	1,46	7,1	68,0
5	5,0	1,0	7,0	1,41	2,8	80,6
6	9,0	1,0	7,0	1,38	7,2	74,0
7	5,0	5,0	7,0	1,52	4,2	<b>101,2</b>
8	9,0	5,0	7,0	1,4	8,1	72,0
9	7,0	3,0	5,0	0,22	5,2	82,0
10	7,0	3,0	5,0	0,26	4,8	84,0
11	7,0	3,0	5,0	0,43	5,1	78,0
12	7,0	3,0	5,0	0,21	4,9	76,8

Em relação à produção de biomassa, dos ensaios, também se verifica um maior aumento para o ensaio 7, com a produção

1,52(g/L) em 144 horas. Como demonstrado no planejamento fatorial os maiores níveis de concentração tanto da fonte de carbono (óleo de oliva) como para o nitrogênio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) para este ensaio podem ter influenciado em maior produção de biomassa correspondendo também uma maior expressão da atividade enzimática.

Os resultados expressos nos diagrama de pareto (Figura 3) apresenta a significância dos resultados, com 95% de confiança, representado pela linha tracejada vermelha, correspondente ao valor de  $p = 0,05$ . As seguintes variáveis independentes: Fonte de Nitrogênio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), Óleo de oliva, pH, influenciaram para a produção de lipase. Sendo que a fonte de nitrogênio e o óleo de oliva foram as variáveis independentes mais relevantes para a produção da enzima, por ambas estarem acima dos valores de  $p$ .

Figura 3. Diagrama de pareto mostrando os efeitos principais e alterações das variáveis independentes no processo de produção de lipase por *Aspergillus sp* (SIS 16) a 144 horas de fermentação a 28°C. (1) pH, (2)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , (3) Óleo de oliva.



Fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas podem se utilizadas para a produção de enzimas. Fontes inorgânicas como os sais de amônio (sulfatos,

fosfatos, cloretos), nitratos e nitritos podem ser utilizadas e adicionadas ao meio na produção de lipase (COLLA, REINEHR, COSTA, 2012).

FALONY, MENDONZA, ARMAS (2006) em seus estudos utilizou como fonte de nitrogênio o sulfato de amônio e a ureia associada a uma fonte de carbono a glicose e um ácido graxo como indutor (óleo de oliva) para a produção de lipase a fim de otimizar o meio para síntese enzimática com *Aspergillus niger* via fermentação submersa, variando as concentrações através de um planejamento fatorial. E constatou que a fonte de nitrogênio influenciou significadamente na atividade lipolítica obtendo um valor equivalente a 77,6 (U/mL) em comparação o indutor que foi de 74,4 (U/mL) e a fonte de carbono que apresentou um resultado inferior de 65,6 (U/mL).

Em estudos sobre produção de lipase, por fermentação submersa (CORZO e RAVAH, 1999) e até em Fermentação em estado sólido (GOMBERT et al., 2000; PALMA et al., 2000; LEAL et al., 2003) descreve que é comum a obtenção de picos de atividade lipasica nas primeiras horas de fermentação. No entanto é possível encontrar relatos onde não se observa queda da atividade lipasica em fermentações conduzidas por até 12 dias (MAIA et al., 1999; DOMINGUEZ et al., 2003; VARGAS (2004); NAGARAJAN 2012).

Resultados superiores foram encontrados no trabalho realizado por OLIVEIRA 2010, onde foram testadas linhagens de *penicillium sp* para a otimização da produção de lipase, obtendo uma atividade máxima de 125(U/mL) em 72 horas, segundo o autor resultado similar ao encontrado por VAGAS2003.

Nos resultados encontrados SILVA, BRUNO, CASTRO, 2009, analisando a imobilização de linhagens de fungos filamentos para a produção de lipases extracelulares o *Aspergillus niger*, obteve uma atividade lipasica de 69,9 (U/mL) em 72horas, enquanto que cepas de *Penicilium citrinum*, alcançou o equivalente a 52,6 (U/mL) no mesmo período de tempo de fermentação.

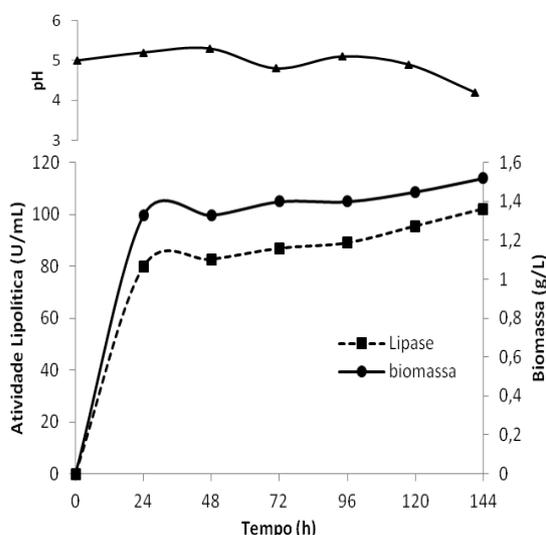
### **CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE LIPASE POR ASPERGILLUS SP (SIS 16) DA MELHOR CONDIÇÃO UTILIZADA NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>3</sup>.**

A cinética de crescimento do ensaio 7, do *Aspergillus sp* (SIS 16) estar representada na figura 4 Percebe-se que houve uma rápida adaptação do micro-organismo na fase no qual ocorre a síntese da enzima e de outros constituintes celulares necessários a absorção dos nutrientes presentes no meio (fase lag). Logo após, na fase log, o micro-organismo cresceu de forma rápida, absorvendo os nutrientes e sintetizando seus constituintes atingindo seu auge em 24 horas. Daí por diante manteve seu crescimento lento e constante durante a sua fase estacionária até às 144 horas de cultivo.

TALON, MONTEL, BERDAGUE, (1996); ABREU (2013) reporta que a concentração de enzima ativa começa a aumentar ao final da fase do crescimento exponencial e atinge seu máximo durante a fase estacionária.

FELLOWS (1994) SOARES et al., (2010) relata que a atividade enzimática ótima das enzimas microbianas ocorre nas mesmas condições em que se produz o crescimento máximo dos micro-organismos.

Figura 4. Crescimento do *Aspergillus sp* (SIS 16) para o ensaio 7, em 144 horas de fermentação a 28°C e pH 5,0.



A variação da faixa do pH estudado durante a cinética de crescimento ocorreu na faixa de 5,0 a 4,2, modificando a faixa inicial como demonstrado na figura 4. De acordo com SHAH et al., (2007); TAVARES (2011), as atividades da lipase são altamente dependentes do pH, e qualquer alteração pode vir a afetar seu potencial catalítico, uma vez que o pH influencia a estrutura de proteínas e, portanto rege a sua atividade catalítica.

De acordo com (BISATTO, 2012) enzimas são polímeros poli-iônico. Como consequência disto, a alteração no pH pode ocasionar a mudança na distribuição de cargas, tanto no sítio ativo da enzima, como também em toda a sua estrutura.

### INFLUÊNCIA DOS SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE LIPASE NA MELHOR CONDIÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>3</sup> POR *ASPERGILLUS SP* SIS 16.

A tabela 3. Apresenta os resultados da produção de biomassa, pH e atividade lipolítica dos resíduos utilizados no ensaio 7 em 192 horas de cultivo. E na

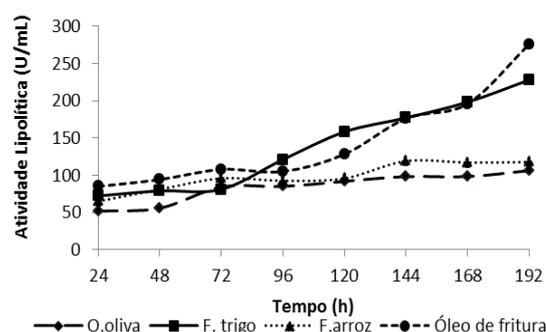
figura 5, podemos observar que em todos os ensaios realizados houve efeitos gerados sobre a produção da enzima.

Visto que, a maior atividade enzimática da produção de lipase ocorreu com o óleo de fritura que foi equivalente a 276 U/mL no pH 6,5 pH 6,0 comparação com os demais estes que apresentaram uma máxima atividade lipolítica inferior em 192 horas de fermentação.

Tabela 3. Produção de biomassa, pH e atividade lipolítica dos ensaios em diferentes resíduos em 192 horas de cultivo a 28°C a 86 rpm.

Resíduos	Biomassa	pH	Lipase U/mL
O.oliva	0,23	3	106,4
F. trigo	0,24	6	228
F.arroz	0,45	6	118
Óleo de fritura	0,32	6,5	<b>276</b>

Figura 5. Atividade Lipolítica por *Aspergillus sp* utilizando diferentes resíduos em cultivo de 192 horas à 28° C e 86 rpm.



Weber, 2013 utilizando o reaproveitamento do óleo de fritura para a produção enzimática de etil e metil, descreve que existe um grande interesse na utilização de lipases como biocatalisadoras para converter comercialmente óleos vegetais e gorduras

em FAME (ésteres metílicos de ácidos graxos), FAEE (ésteres etílicos de ácidos graxos) como biocombustíveis.

As enzimas são mais eficientes, altamente seletivas, necessitam de menor consumo de energia (as reações podem ser conduzidas em temperatura ambiente) e produzem menor quantidade de resíduos, sendo desta forma ambientalmente favorável., reporta a capacidade de reutilização, podendo ser utilizadas diversas vezes, diminuindo o custo de produção do metil e etil ésteres de ácidos graxos. O rendimento da esterificação de ácidos graxos catalisada por lipase é modulado pela razão de substrato álcool/óleo (TAN *et al.*, 2010).

DAMASSO *et al.* 2008 produziu lipases fúngicas utilizando como indutor resíduos do processamento do óleo de milho. Um dos resíduos foi capaz de induzir uma secreção de lipases 30% maior que a observada quando utilizado o óleo de oliva, tido como o indutor ideal para lipases.

MIRANDA *et al.*, 1999 utilizando cepas de *Penicillium Citrinum* e um meio contendo resíduo de óleo vegetal de uma refinaria como fonte de carbono e sulfato de amônia como fonte de nitrogênio reporta que a produção de lipase foi maior (5786 U/mL) do que o obtido com azeite de oliva (2630 U/I). o mesmo autor descreve que a produção de lipase não foi interrompida pela presença de lipídios como descrito por PIMENTEL *et al.*, 2004, em que foi cultivada com glicose como fonte de carbono e não azeite.

OLIVEIRA (*et al.*, 2013) reporta que para baratear a produção destas enzimas algumas estratégias podem ser adotadas, como a substituição dos componentes do

meio de cultivo por materiais de baixo custo ou até mesmo resíduos.

#### 4. CONCLUSÕES

A utilização de rejeitos agroindustriais para a elaboração de meios econômicos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado tem surgido como uma alternativa para minimizar os custos de produção e também o descarte de uma grande maioria de resíduos com elevado potencial nutritivo.

O meio contendo o resíduo de óleo de fritura apresentou uma elevada produção de lipase, quando comparado aos demais meios testados, o denominado controle que continha óleo de oliva e aos demais meios alternativos contendo farelos de arroz e de trigo, respectivamente.

Verificou-se a habilidade da amostra isolada da Caatinga *Aspergillus sp* (SIS 16) em quebrar as moléculas dos ácidos graxos presentes no resíduo, transformando-os na enzima estudada.

Esses estudos de produção enzimática revelam o elevado potencial biotecnológicos dos fungos isolados do solo da caatinga do Estado de Pernambuco.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Projeto SISBIOTA-CNPq pelo suporte financeiro para realização desse trabalho, e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pela infraestrutura para execução de toda parte experimental.

## 5. REFERENCIAS

- ABREU, Ligia de. **Influência de diferentes estratégias de cultivo na produção de lipase por *Staphylococcus Warneri* Ex 17 e propriedades desta enzima após imobilização em suportes hidrofóbicas.** 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 02, p. 364-368, 2007.
- BARROS, Rubens Pessoa de. Diversidade de fungos em um vertissolo com adição de vinhaça na cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*). **Revista Uniabeu**, Alagoas, v. 5, n. 10, p.181-195, 2012.
- BENJAMIN S, PANDEY A. Mixed-solid substrate fermentation. A novel process for enhanced lipase production by *Candida rugosa*. **Acta Biotechnol** v.18, n.4, p. 315–24.1998.
- BISATTO, Rubens. **Poliésteres Via Catálise Enzimática Heterogênea.** 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- CARVALHO, P.O et, al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 22-24, 2003.
- COLLA, Luciane Maria; REINEHR, Christian Oliveira; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Applications and production of microbial lipases. **Ciatec- Upf**, Passo Fundo RS, v. 4, n. 2, p.1-14, 2012.
- CORZO, G., REVAH,S. Production and characteristics of the lipase from *yarrowia lipolytica* 681. **Biorres. Technol.**, v.70. p. 173-180, 1999.
- DAMASO, Mônica Caraméz Triches et al. Utilization of agroindustrial residues for lipase production By. **Brazilian Journal Of Microbiology**, p. 676-680, 2008.
- DOMÍNGUEZ, A. et al. Novel application of solid state culture: Production of lipase by *yarrowia lupolytica*. **Biotech. Letters**, v. 25, p. 1225-1229, 2003.
- FALONY, G.; MENDONZA, J.C.D.; ARMAS, J.C. Obtention of *A. niger* lipases by solid state fermentation. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, Recife, 2005.
- FELLOWS, P. **Tecnología del procesado de los alimentos: principios e prácticas.** Zaragoza: Editorial Acribia, p. 172-177, 1994.
- FERANDES, M. L. M. **Produção de lípases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise.** Dissertação de Mestrado, UFPR, 2007.
- FERNANDES, A. F.; PEREIRA, J.; GERMANI, R.; OIANO-NETO, J. Efeito da substituição parcial da farinha de trigo por farinha de casca de batata (*Solanum Tuberosum Lineu*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, suppl., p. 56-65, 2008.
- GOMBERT, A.K. et al. Lipase production by *penicillium restrictum* in solid state fermentation using babassu oil cakes as substrate. **Process Biochem.**, v. 35, p. 85-90, 2000.
- GOTTSCHALK, L.m.f. et al. COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS XILANASE E FERULOIL ESTERASE EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA PELA CEPA MUTANTE *Aspergillus niger*

3T5B8. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, Rio de Janeiro, p.01-04, 02 ago. 2013.

GUIMARÃES, Luis Henrique S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal Of Microbiology**. São Paulo, p. 474-480. mar. 2006.

HASAN, Fariha; SHAH, Aamer Ali , HAMEED, Abdul. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology** vol.39, issue 2,p.235-251. Islamabad, Pakistan.2006.

HORCHANI, Habib et al. Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. India, p. 237-245. abr. 2009.

LEAL, M.C.M.R. **Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios**. 2000. 87f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

LOPES, Fernanda Cortez. **Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos**. 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2011.

MACEDO, L.N; OLIVEIRA, A.C.P; FERREIRA, A.D.F; DAMASO, M.C.T; COURI,S. Estudo da Influência de Variáveis de Processo na Produção de Lipases por Fungo Filamentoso. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 07., 2009, Rio de Janeiro. **Anais...** . Natal Rn: Embrapa, 2009. p. 01 - 05.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocessos para produção de xilanases por fermentação no estado sólido**

**utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2006. 129 p.

MAGRI, Agnes et al. Efeito do pH sobre a produção de lipase e biomassa de *Acinetobacter calcoaceticus*. **Biochemistry And Biotechnology Reports**, Londrina, v. 2, n. 3, p.277-280, jun. 2013.

MAIA, M.M.D; MOARAI, M.M.C; JR.MORAIS, M.A; MELO, E.H.M; LIMA FILHO, J.L.L; Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium Solani* FS1. **Rev. de Microbiol.**, v.30, p.01-10, 1999.

MENEZES, J.D.S ; DRUZIAN,J.I ; PADILHA, F.F ; SOUZA,R.R. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. **Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Cascavel, v. 8, n. 8, p.1761-1776, dez. 2012.

MIRANDA,O.A ; SALGUEIRO,A ; PIMENTEL,M.C.B ; LIMA FILHA, J.L ; MELO,E.H.M ; DURAN, N. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. **Bioresource Technology**, Campinas - Sp, v. 4, n. 69, p.145-147, 20 jun. 1999.

MONTEIRO, Mônica Cristina. **Identificação de Fungos dos Gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras Mg, Lavras Mg, 2012.

NAGARAJAN, Saisubramanian. New Tools for Exploring“Old Friends— Microbial Lipases. **Appl Biochem Biotechnol**, Tamil Nadu, India, n. , p.01-34, 2012..

OLIVEIRA, Anne Caroline Defranceschi. Otimização da produção de lipases por *penicillium sp*. Através de fermentação

submersa. **Bioresource Technology**, Paraná, v. 8, n. 3, p.01-04, 03 maio 2010.

OLIVEIRA, Fábio Rodrigo de. **Prospecção de fungos para o controle de *Anticarsia gemmatalis* hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agrobiologia, Departamento de Centro De Ciências Naturais E Exatas, Universidade Federal De Santa Maria, Santa Maria RS, 2013.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de Resíduos Agro-Industriais em Processos Biotecnológicos como Perspectiva de Redução do Impacto Ambiental. **Journal of Technology Management & Innovatium**, v.2., 2007.

PIMENTEL et al., Brasiliam strain of *Penicillium Citrinum* lipase: heat-denaturation and pH stability Studies. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 66, p. 185-195, 1997.

RITTER, Ana Carlolina. **Potencial Toxogênico de *Aspergillus Flavus* testados em diferentes meios de condições**. 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Departamento de Pós Graduação de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre Rs, 2007.

SANTOS, V.L.; LINARDI, V.R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents - identification and degradation potential. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1001-1006, 2004.

SBARDELOTTO, Marina et al. Avaliação da produção de lipase microbiana a partir de *Aspergillus sp.*, utilizando torta de canola como substrato. **Biochemistry And Biotechnology Reports**, Rio Grande do Sul, v. 2, n. 3, p.293-296, mar. 2013.

SCHNEIDER, Cristina Fernanda et al. FORMAS DE GESTÃO E APLICAÇÃO DE RESÍDUOS DA CANA-DE-AÇÚCAR

VISANDO REDUÇÃO DE IMPACTOS AMBIENTAIS. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró Rn, v. 7, n. 5, p.08-17, 2012.

SILVA, Grazielle dos Santos; BRUNO, Laura Maria; CASTRO, Heizir Ferreira de. Seleção e Imobilização de Fungos Filamentosos Produtores de Lipase Intracelular. **Quim. Nova**, Fortaleza, v. 5, n. 8, p.01-07, ago. 2009.

SILVA, Mayara Barbosa; RONDON, Josimara Nolasco. Utilização de fungo de bambu na biorremediação de solo contaminado. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Mato Grosso do Sul, v. 10, n. 10, p.2175-2184, 2013.

SOARES, Izabel Aparecida et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Toledo - Pr., v. 3, n. 30, p.700-705, 2010.

SUBHASH, G. Venkata; MOHAN, S. Venkata. Biodiesel production from isolated oleaginous fungi *Aspergillus sp.* using corncob waste liquor as a substrate. **Bioresource Technology**, India, v. 28, n. 2, p.9286-9290, 23 jun. 2011.

TEIXEIRA, Alessandra Zarpellon et al. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOCONVERSÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE INOCULAÇÃO. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Paraná, v. 5, n. 2, p.450-457, fev. 2011.

VARGAS, G.D.L.P. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR *PENICILLIUM SIMPLICISSIMUM* UTILIZANDO TORTA DE SOJA COMO SUBSTRATO Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Ciências Agrária-Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim, 98f. 2004.

WEINGARTNER, Valesca. **Produção, purificação e identificação de mananase obtida por fermentação no estado sólido utilizando cascas de soja e *aspergillus niger*.** 2010. 158 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Bioprocessos e

Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ZILLI et al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, set.. 2003.

## **CAPÍTULO IV**

## CONCLUSÕES GERAIS

Dentre as amostras de *Aspergillus sp* utilizadas para a seleção dos melhores produtores de lipase, os micro-organismos SIS 10 e SIS 16 obtiveram um bom resultado dentre todas as amostras testadas. Com relação aos meios de produção utilizados neste trabalho o meio denominado 4 foi o que apresentou uma melhor produção da enzima para os dois micro-organismos citados em 144 horas de fermentação.

Um planejamento fatorial foi realizado utilizando o meio denominado 4 para a produção de lipase, apresentando 12 ensaios, tendo como variáveis a fonte de nitrogênio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), o indutor (óleo de oliva) e o pH. Nos ensaios realizados o denominado 7 foi considerado o mais satisfatório.

Para avaliar a influência da fonte de carbono na produção da enzima o ensaio denominado 7 foi utilizado na substituição do óleo de oliva pelos resíduos agroindustriais (farelo de trigo, farelo de arroz e óleo de fritura). Em 150 rpm, por 196 horas, a 28°C, obtendo uma maior atividade lipolítica com o resíduo de óleo de fritura quando comparado com os outros resíduos.

Esses resultados demonstram a capacidade da utilização de resíduos agroindustriais como substratos alternativos nos segmentos biotecnológicos, visando minimizar os impactos ambientais bem como a produtividade de baixa renda através de enzimas microbianas.