



**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES POR *Aspergillus* DA  
MICOTECA URM UTILIZANDO RESÍDUO DE LICURI (*Syagrus coronata*)  
(Martius) Beccari COMO SUBSTRATO**

**CYNDY MARY DE MELLO FARIAS**

**RECIFE  
FEVEREIRO/ 2013**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES DE *Aspergillus* DA  
MICOTECA URM UTILIZANDO RESÍDUO DE LICURI (*Syagrus coronata*)  
(Martius) Beccari COMO SUBSTRATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

**Área de Concentração:** Micologia Aplicada  
**Nome do aluno:** Cyndy Mary de Mello Farias  
**Orientador:** Dr<sup>a</sup>. Cristina Maria de Souza Motta  
**Co-orientador:** Dr<sup>a</sup>. Keila Aparecida Moreira

**RECIFE  
FEVEREIRO/2013**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

F224p Farias, Cyndy Mary de Mello

Produção e caracterização de lípases de *Aspergillus da* Micoteca URM utilizando resíduo de Licuri (*Syagrus coronata*) (Martius) Beccari como substrato / Cyndy Mary de Mello Farias. – Recife: O Autor, 2013.

78. : il., fig., tab.

Orientadora: Cristina Maria de Souza Motta

Coorientadora: Keila Aparecida Moreira

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2013.**

Inclui bibliografia

**1. Fungos 2. Enzimas de fungos 3. Fermentação I. Motta, Cristina Maria de Souza (orientadora) II. Moreira, Keila Aparecida (coorientadora) III. Título.**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES DE *Aspergillus* DA  
MICOTECA URM UTILIZANDO RESÍDUO DE LICURI (*Syagrus coronata*)  
(Martius) Beccari COMO SUBSTRATO**

**CYNDY MARY DE MELLO FARIAS**

Data da defesa: 26 de fevereiro de 2013

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**MEMBROS TITULARES**

Dra. Cristina Maria de Souza Motta – (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Micologia

Dra. Oliane Maria Correia Magalhães – Examinador Interno  
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Micologia

Dr. Ranilson de Souza Bezerra – Examinador Externo  
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica.

**MEMBROS SUPLENTE**

Dra. Norma Buarque de Gusmão – Examinador Interno  
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Antibióticos

Dr. Bruno Severo Gomes – Examinador Externo  
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Micologia

*Morre lentamente  
quem se transforma em escravo do hábito,  
repetindo todos os dias os mesmos trajetos,  
quem não muda de marca não se arrisca a vestir uma nova cor  
ou não conversa com quem não conhece.*

*Morre lentamente  
quem faz da televisão o seu guru.*

*Morre lentamente  
quem evita uma paixão,  
quem prefere o preto no branco  
e os pingos sobre os "is" em detrimento de um redemoinho de emoções,  
justamente as que resgatam o brilho dos olhos, sorrisos dos bocejos,  
corações aos tropeços e sentimentos.*

*Morre lentamente quem não vira a mesa quando está infeliz com o seu trabalho,  
quem não arrisca o certo pelo incerto para ir atrás de um sonho,  
quem não se permite pelo menos uma vez na vida, fugir dos conselhos sensatos.*

*Morre lentamente  
quem não viaja,  
quem não lê,  
quem não ouve música,  
quem não encontra graça em si mesmo.*

*Morre lentamente  
quem destrói o seu amor-próprio,  
quem não se deixa ajudar.*

*Morre lentamente,  
quem passa os dias queixando-se da sua má sorte ou da chuva incessante.*

*Morre lentamente,  
quem abandona um projeto antes de iniciá-lo,  
não pergunta sobre um assunto que desconhece  
ou não responde quando lhe indagam sobre algo que sabe*

*Evitemos a morte em doses suaves,  
recordando sempre que estar vivo exige um esforço muito maior que o simples fato de  
respirar.*

*Somente a perseverança fará com que conquistemos  
um estágio esplêndido de felicidade.*

*Pablo Neruda*

## *Dedico...*

A minha estrelinha do céu, minha amada  
Vovó Zezete (*in memoriam*), pelas inúmeras  
vezes que sentou ao meu lado me ensinando  
com um simples olhar a ser quem eu sou.

## *Ofereço...*

Ao meu “anjo da guarda”, meu noivo  
Rômulo por me apoiar nos momentos de  
turbulências, demonstrando compreensão, carinho e  
amor.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos (PPGBF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelo apoio no desenvolvimento do projeto e por possibilitarem a minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo durante a realização deste projeto.

Às minhas orientadoras, Dr<sup>a</sup>. Cristina Maria de Souza Motta e Dr<sup>a</sup>. Keila Aparecida Moreira, pela excelente orientação, dedicação, compreensão e paciência durante a realização desta dissertação, principalmente pelo respeito e amizade.

Aos pesquisadores e funcionários do Departamento de Micologia pelo bom atendimento e ensinamentos.

Aos meus pais, João Carlos Vesparsiano Borges e Cintia Maria Farias Tenório, por acreditarem no meu potencial, escutando e mostrando os caminhos a serem seguidos.

Aos meus irmãos Fábio, Fabiana, Suendy, aos meus adorados sobrinhos Davison e Wendy, meus tios Christiano, Kátia, Natália, Rose, Vera, aos meus primos Diogo, Camila, Carlos, Carol, Karenina pelas belas risadas e companheirismo.

A Rômulo, pela amizade, dedicação, companheirismo e delicado amor.

Aos amigos do Departamento de Micologia, principalmente, Bruno, Dianny, Juliana, Julyanna, Maria, Minelli, Nelson, Odacy, Phelipe, Renan, Roberta, Susana, Tatianne e Vanilla pelos prazerosos dias de convivência no decorrer desses anos.

A turma do Mestrado, Alice, Camilla, Edvaneide, Gleiciere, Iolanda, Jadson, Jacilene, Juliana, Mayara, Patrícia, Vera, Vitor e Victor, pelo leque de conhecimentos e pela ciência de cada um.

Aos amigos de toda vida, Cecília, Diógenes, Edinelli, Emilia, Emanuely, Eudmar, Gleyson, Mario, Isabela, Paula, Ricardo, Teresa, Thiago.

## RESUMO GERAL

Espécies de *Aspergillus* vem sendo objeto de estudos devido à capacidade de produzir lipases, aumentando sua aplicabilidade em escala industrial. A grande demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características tem estimulado a procura de novas cepas de microrganismos lipolíticos, principalmente de fungos, ou a busca de novas fontes de carbono com o interesse em otimizar a produção de lipases utilizando substrato de baixo valor comercial. Os objetivos deste trabalho foram detectar e produzir lipases utilizando como substratos resíduo de licuri por culturas de *Aspergillus* mantidas na Micoteca URM; selecionar o melhor produtor, verificar as melhores condições de produção da enzima e determinar o efeito e a estabilidade das lipases ao pH e a temperatura. Foram realizadas a reativação e autenticação das culturas através das características morfofisiológicas. A detecção da atividade lipásica foi realizada utilizando Tween 20 como substrato. Na fermentação em estado sólido utilizou-se resíduo de licuri como fonte de carbono. Para determinação das melhores condições de produção foi realizado planejamento fatorial completo ( $2^4$ ) com as variáveis temperatura, pH, teor de umidade e concentração de indutor. A enzima foi caracterizada parcialmente quanto ao pH e temperatura ótimos e estabilidade ao pH e à temperatura. Das 18 culturas preservadas sob óleo mineral, no período de 5 anos, todas permaneceram viáveis e foram autenticadas. Na seleção do produtor de lipases nenhuma cultura foi capaz de apresentar halo de degradação, entretanto em fermentação em estado sólido utilizando farelo de licuri todas as culturas produziram lipases com atividades que variaram de 74,33 a 197,44 U/gss. *A. candidus* URM 5611 apresentou um bom desempenho com atividade lipolítica de 197,44 U/gss, após 48 horas de fermentação, sendo selecionado para a produção e caracterização parcial da enzima. Após a produção da enzima em diferentes condições, atividade máxima de lipases foi de 121,856 U/gss em 48 h de fermentação nas condições: 75% de umidade, pH 5,5, 0% de indutor a 25°C. A lipase apresentou atividade ótima em pH 2,5 a 65°C e estabilidade na faixa de pH 2,5 a 9,0 de 30 a 80°C. Culturas de *Aspergillus* preservadas sob óleo mineral em coleções de culturas são capazes de manter as características morfofisiológicas. *A. candidus* é uma espécie promissora para produção de lipases com perspectiva de aplicação em escala industrial. O uso de resíduo agroindustrial para obtenção de lipases torna-se uma ferramenta para o desenvolvimento de tecnologias limpas, convertendo o resíduo em questão em um produto de maior valor agregado.

**Palavras-chave:** *Aspergillus*, fermentação em estado sólido, lipases, resíduo agroindustrial.

## ABSTRACT

*Aspergillus* species has been studied because their ability to produce lipases, increasing its applicability on an industrial scale. Due to the high industrial demand for new sources of lipases with different characteristics, the search for new strains of lipolytic micro-organisms, especially fungi, and the looking for new sources of carbon with interest in optimize the production of lipases with substrate-reduced commercial has been stimulated. The objectives of this study were to detect and produce lipases as substrates from licuri residue in *Aspergillus* crops maintained at URM Culture Collection; select the best producer, check out the best conditions for enzyme production and determine the effect and stability of lipases against pH and temperature. The reactivation and authentication of cultures were made through the physical and physiological characteristics. Lipases detection was performed using Tween 20 as substrate. The solid state fermentation used bran licuri as carbon sources according to standardized methodology. To determine the best conditions of production was made a complete factorial design ( $2^4$ ) with the parameters of temperature, pH, moisture content and concentration of inducer. The enzyme was partially characterized by the parameters of effect and stability to pH and temperature. Of the 18 cultures preserved under mineral oil to 5 years, 14 remained viable and were authenticated confirming the species deposited. In the detection test, no culture of was able to present halo of degradation, however in submerged fermentation with olive oil and castor oil, all cultures produced lipases which ranged from 74,33 to 197,44 U/gss. *A. candidus* URM5611 had a good performance on lipolytic activity of 197,44 U/gss in bran licuri, after 48 hours of fermentation, being selected for characterization of the enzyme. The maximum activity of lipase was 121.856 U/gss in 48h of fermentation conditions: 75% moisture, pH 5.5, 0% inducer at 25°C. The lipases showed optimal activity at pH 5.4 at 70°C and stability in the pH range of 2.5 and 9.0 at 30 and 80°C. *Aspergillus* cultures stored under mineral oil in culture collections for long periods are able to maintain the physical and physiological characteristics and the ability to produce lipases, especially *A. candidus*, becoming a promising species with potential for application in industrial scale.

**Keywords:** *Aspergillus*, solid state fermentation, lipases, agroindustrial residue.

## Lista de figuras

<b>Revisão da literatura</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1 - Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol .....	22
Figura 2- Partes da plameira licuri ( <i>Syagrus coroata</i> ): folha (A); caule (B); flor (C); fruto (D) .....	34
Figura 3- Principais consumidores do licuri: colhedora (A); arara- azul-de-Lear (B).....	35
Figura 4 - Produtos comercializados originados do licuri: óleo de licuri (A); licuri em conserva (B); cestas feitas com a palha da palmeira (C).....	36
Figura 5- Processo de extração do óleo de licuri .....	37
Figura 6- Torta de licuri .....	38
 <b>Capítulo 1</b>	
Figura 1 – <i>Aspergillus ochraceus</i> URM 5609; A) Colônia em agar extrato de levedura czapeck (CYA) com quatro dias de crescimento a 25°C; B) Conidióforos hialinos bisseriados e vesícula globosa (aumento de 40x ).....	46
Figura 2 – Efeito (—◆—) e estabilidade (—■—) ao pH na atividade lipolítica produzida por <i>Aspergillus candidus</i> URM 5611 após 180 minutos de incubação com pH inicial variando de 2,5 a 9,0.....	49
Figura 3 – Efeito (—◆—) e estabilidade (—■—) da temperatura na atividade lipolítica produzida por <i>Aspergillus candidus</i> URM 5611 após 180 minutos de incubação com temperatura inicial variando de 30 a 80°C em intervalos de 5°C.....	51
 <b>Capítulo 2</b>	
Figura 1 - Gráfico de Pareto dos efeitos das interações quanto à resposta da atividade lipolítica com 48h de cultivo.....	60
Figura 2 - Gráfico quadrado das variáveis (indutor e umidade) tendo como variável resposta a atividade lipolítica.....	62

## Lista de tabelas

	<b>Pág.</b>
<b>Revisão da literatura</b>	
Tabela 1 - Principais micro-organismos envolvidos na produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES).....	30
Tabela 2 - Composição química da polpa e da amêndoa do fruto de licuri ( <i>Syagrus coronata</i> ).....	37
 <b>Capítulo 1</b>	
Tabela 1 – Viabilidade e autenticação taxonômica de culturas de <i>Aspergillus</i> preservadas sob óleo mineral na Coleção de Culturas - Micoteca URM .....	45
Tabela 2 – Atividade lipolítica total (U/gss) produzidas por culturas de <i>Aspergillus</i> , utilizando como substratos farelo de licuri incubadas por 96h.....	48
 <b>Capítulo 2</b>	
Tabela 1 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo ( $2^4$ ) para a produção de lipases por <i>Aspergillus candidus</i> URM 5611.....	56
Tabela 2 - Resultados do planejamento experimental para a produção lipolítica por fermentação em estado sólido de <i>Aspergillus candidus</i> URM 5611.....	59

## SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	16
2.1. Coleção de Cultura .....	16
2.1.1. Métodos de preservação .....	17
2.2. <i>Aspergillus</i> .....	19
2.3. Lipases .....	21
2.3.1. Lipases de origem microbiana .....	23
2.3.2. Aplicações das lipases .....	25
2.4. Fermentação em Estado Sólido (FES) para produção de enzimas .....	27
2.4.1. Produção de lipases por fungos filamentosos utilizando a FES .....	29
2.4.2. Fatores que afetam a produção enzimática por FES .....	30
2.5. Substratos utilizados na FES .....	31
2.5.1. Licuri .....	33
CAPÍTULO 1. SELEÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>ASPERGILLUS</i> PARA PRODUÇÃO DE LIPASES UTILIZANDO FARELO DE LICURI, <i>SYAGRUS CORONATA</i> (MARTIUS) BECCARI .....	39
Resumo .....	40
Introdução .....	40
Metodologia .....	41
Resultado e discussão.....	45
Conclusões .....	52
Agradecimentos .....	53
CAPÍTULO 2. PRODUÇÃO DE LIPASES POR <i>ASPERGILLUS CANDIDUS</i> URM 5611 UTILIZANDO RESÍDUO DE BAIXO VALOR COMERCIAL .....	53
Resumo .....	54
Introdução .....	54
Metodologia .....	56
Resultado e discussão .....	57
Conclusão .....	63
Agradecimentos .....	63

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65

## 1. INTRODUÇÃO

Lipases são enzimas que catalisam uma variedade de reacções, tais como a hidrólise completa ou parcial de triacilgliceróis e as reacções de esterificação, transesterificação e interesterificação de lípidios (Colla et al., 2010). Uma das áreas de pesquisa envolvendo lipases atualmente se concentra sobre o uso de microorganismos, suplementos e substratos para determinar as melhores combinações para obter as lipases de alto valor, utilizando as condições operacionais que facilitam a redução dos custos de produção em escala industrial (Rigo et al., 2010). As lipases microbianas apresentam uma série de vantagens se comparadas com as lipases extraídas de fontes animais e vegetais. Estas vantagens estão relacionadas a algumas das características peculiares das lipases como a estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH (Sharma et al., 2001; Treichel et al., 2010).

As lipases são importantes enzimas industriais, devido às suas aplicações versáteis (Mahadik et al., 2002; Pandey, 2003). O recente interesse na produção de lipases está associado com as suas aplicações como aditivos nos alimentos (modificação de sabor), química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de águas residuais (decomposição e remoção de substâncias oleosas), cosméticos (remoção de lípidos), produtos farmacêuticos (digestão de óleos e gorduras em alimentos), processamento de couro (remoção de lípidios a partir de peles de animais) e ensaios biomédicos (triglicérides no sangue) (Elibol e Ozer, 2000; Kamini et al, 2000; Burkert et al., 2004, Sing e Mukhopodhyay, 2012). Além disso, as lipases tem uma aplicação importante no campo da bioenergia, especialmente na produção de biodiesel, que é um sector de expansão, como resultado da demanda mundial em ascensão no uso de energia renovável (Colla et al., 2010).

No entanto, as enzimas disponíveis comercialmente apresentam ainda custo elevado, uma vez que a maioria dos processos de produção é baseada em fermentação submersa, o que muitas vezes pode tornar a sua utilização pouco atrativa economicamente (Castilho et al., 2000). Assim, a busca por processos de produção de lipases que possam diminuir os custos finais da enzima são de grande interesse, pois pode viabilizar algumas aplicações pouco exploradas, como por exemplo, o tratamento de efluentes gordurosos (Leal et al., 2002). Isto pode ser conseguido através do uso de

substrato de baixo custo, especialmente resíduos de agroindústria para que a produção pode se tornar economicamente mais viável (Godoy et al., 2011).

A fermentação em estado sólido (FES) tem se mostrado como uma alternativa na produção de enzimas microbianas, devido à possibilidade de utilização de resíduos e subprodutos da agroindústria como fonte de nutrientes e suporte para o desenvolvimento do micro-organismo (Castilho et al., 2000; Soccol e Vandenberghe, 2003; Pandey, 2003).

Algumas considerações importantes para o desenvolvimento da FES incluem a seleção adequada do substrato e micro-organismo, otimização dos parâmetros do processo e separação, e purificação dos produtos. De uma maneira geral, este é um processo que emerge como uma tecnologia em potencial para a produção de diversos produtos de origem microbiana, principalmente para a produção de enzimas fúngicas (Pandey, 2003).

Para a produção industrial de enzimas microbianas, os micro-organismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; produzirem a enzima em velocidade elevada, constante e em curto espaço de tempo; os métodos para a recuperação devem ser simples; a preparação enzimática obtida deve apresentar estabilidade. O êxito da produção industrial de enzimas depende do grau em que a atividade dos micro-organismos é alcançada e quando se reduzem custos do substrato empregado, da incubação e da recuperação da enzima (Slivinski, 2007).

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. 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 produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental. Estes resíduos e subprodutos gerados pela agroindústria podem ser reaproveitados para obtenção de novos produtos (Pinto, 2005).

Como principal fornecedora de recursos naturais para as populações rurais, a Caatinga condiciona sobremaneira as atividades humanas na região semi-árida nordestina (Brasil, 2008). Dentre as centenas de espécies naturalmente ocorrentes no bioma Caatinga, merecem especial destaque aquelas representantes da família *Arecaceae*, porquanto que as palmeiras estão presentes em quase toda a abrangência do seu território e apresentam elevada importância ambiental e socioeconômica regional (Souza e Lorenzi, 2008).

Dentre as *Arecaceae* de ocorrência natural na Caatinga destaca-se *Syagrus coronata* (Mart.) Becc., que é considerada uma das mais importantes palmeiras da região semiárida brasileira, é regionalmente conhecida como licuri (Drumond, 2007). O licurizeiro apresenta grande importância nos municípios onde se encontra, pois representa fonte de renda para a população. Das suas folhas, são confeccionados sacolas, chapéus, vassouras, espanadores, etc. Da amêndoa pode ser extraído um óleo além de ser consumida *in natura*, sendo muito utilizada na culinária baiana. Do resíduo obtido com a extração do óleo, originam-se a torta e farelo, também comercializados, que servem como alimento para animais (Carvalho et. al., 2005).

Dentro deste panorama, os objetivos deste trabalho foram avaliar a produção de lipases por fermentação em estado sólido utilizando espécies de *Aspergillus* e um subproduto da indústria de óleo de licuri como substrato. Investigou-se o efeito de algumas variáveis de processo e diferentes suplementações do meio sobre a produção de lipase em escala de bancada, utilizando a técnica de planejamento fatorial de experimentos, visando obter condições que maximizem a produção de enzima.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Coleção de Cultura

Coleções de culturas são centros de conservação que tem a função de coletar micro-organismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas, tornando-os disponíveis para os usuários (Abreu e Tutunji, 2004). Considera-se a preservação e manutenção dos micro-organismos eficaz, quando esta é feita num estado viável, de forma a garantir seus aspectos morfológicos, fisiológicos, genéticos e metabólicos, assim as culturas quando solicitadas para estudos de taxonomia, bioquímica, diagnóstico laboratorial e produção de substâncias de interesse comercial e industrial devem manter tais características preservadas (Baker e Jefries, 2006).

A alternativa da conservação desses micro-organismos *ex-situ* é uma garantia de acesso em longo prazo, pois diversos grupos de micro-organismos não são satisfatoriamente conhecidos e estudados, o que torna preocupante, pois apenas 2% das espécies de uma estimativa de 1.800 estão sendo preservados em coleções de culturas (Gottschal et al., 2009).

Atualmente, existem 586 coleções de culturas distribuídas em 68 países, o Brasil possui 59 coleções de culturas preservando em torno de 37.737 culturas de diversos micro-organismos (World Data Center For Microorganisms, 2012).

A Coleção de Culturas - Micoteca URM (University Recife Mycology) do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco foi fundada em 1954 pelo Prof. Augusto Chaves Batista, utilizando óleo mineral como método de preservação (Sherf, 1943). O seu acervo consta de aproximadamente 8.000 culturas de fungos, sendo cerca de 1.300 leveduras e 6.700 fungos filamentosos, desses últimos 713 são do gênero *Aspergillus* onde 35 culturas foram isoladas de resíduo agroindustrial, todas identificadas em nível de espécies e mantidas em duplicata em cada método de preservação (Micoteca, 2012).

A Micoteca URM, utiliza os métodos de preservação sob óleo mineral para todas as amostras (fungos filamentosos e leveduras), liofilização para culturas com boa esporulação e para leveduras, e água destilada esterilizada apenas para Zygomycetes e para espécies patogênicas ao homem e vegetais, e o método de ultracongelamento a -80°C em culturas, como as raras e as de importância econômica (Micoteca, 2012).

A variedade dos métodos recomendados e descritos na literatura internacional, de certa forma, reflete a falta de um método que seja abrangente e satisfatório para todos os fungos (Figueiredo, 2001).

### **2.1.1 Método de preservação**

As coleções de culturas têm como função preservar, manter e distribuir linhagens de micro-organismos com suas características originais, pelo maior período possível e por um método que não permita ou minimize a ocorrência de mutações ou de variabilidade quanto à patogenicidade, virulência ou características básicas da cultura original (Romeiro, 2001; Baker; Jefries, 2006). Assim, para a preservação desses micro-organismos a curto, médio e longo prazo, tornou-se necessário desenvolver estudo sobre a biologia, bem como testes sobre os melhores métodos de preservá-los (Rodrigues et al., 1999).

Para garantir a completa viabilidade e estabilidade dos organismos estocados, são utilizados métodos de preservação que têm basicamente o mesmo princípio retardar ou parar o metabolismo celular dos fungos. Nesse sentido, inúmeros processos podem ser utilizados (Smith; Onions, 1994; Neufeld; Sarquis, 2003).

Os principais métodos de preservação utilizados são temperaturas baixas, nitrogênio líquido, sílica-gel, solo ou areia, tecidos secos do hospedeiro, repicagem periódicas, água destilada ou método de Castellani, óleo mineral e liofilização (Aparecido et al., 2001).

A preservação dessas culturas deve ser feita de forma a garantir sua sobrevivência, estabilidade, e pureza durante período prolongado de tempo, conservando características genéticas e propriedades morfofisiológicas, tornando-se assim, centros de excelência para o desenvolvimento de pesquisas em biodiversidade, sistemática e aplicação biotecnológica (Abreu; Tutunji, 2004).

Recomenda-se que as coleções preservem culturas por pelos menos dois métodos de preservação, pois os resultados de viabilidade e estabilidade morfofisiológica e genética diferem para cada espécie, assim nenhuma técnica apresenta sucesso quando aplicada a todos os fungos (Rodrigues et al., 1992; Lima; Borba, 2001; Micoteca, 2012).

O método sob óleo mineral foi proposto por Sherf (1943), consiste em recobrir culturas jovens cultivadas em meios de cultura específicos para desenvolvimento do fungo a ser preservado, contido em tubo de ensaio, com uma camada de 1 cm de altura de óleo mineral em relação a cultura. A manutenção pode ser à temperatura ambiente ou de acordo com a necessidade do fungo, sendo os tubos mantidos permanentemente na posição vertical para que o óleo não toque nos tampos de algodão (Smith; Onions, 1994). Essa camada limita a quantidade de oxigênio disponível, reduzindo a atividade metabólica e crescimento, além de evitar a desidratação do meio de cultura (Smith; Onions, 1994; Figueiredo, 2001; Nakasone et al., 2004). Esse método tem sido eficaz em vários estudos para diferentes grupos de fungos (Braz et al., 2009). Esse método foi extensivamente usado inicialmente em 1947 por Buell e Weston, e subsequentes trabalhos indicaram sucesso na sua ampla aplicação (Smith; Onions, 1994).

As vantagens do método sob óleo mineral estão relacionadas ao baixo custo com equipamentos, eficiência no controle da contaminação por ácaros, manutenção da viabilidade das espécies por um longo período e armazenamento de espécies que não sobrevivem em outros métodos. Enquanto que a dificuldade do crescimento de algumas culturas reativadas, espaço para armazenamento dos tubos, rotina de repicagem para manutenção das espécies e contaminação por outros organismos são algumas das desvantagens dessa técnica (Smith; Onions, 1994; Figueiredo, 2001).

A reativação das culturas preservadas sob óleo mineral é realizada pela remoção de fragmentos dessas culturas, sendo transferidos para um meio submerso ou sólido (Nakasone et al., 2004; Braz et al., 2009).

Em 1991, Lima avaliou 82 culturas de *Fusarium*, preservadas sob óleo mineral na Micoteca URM durante o período de 4 a 32 anos, 81 (98,7%) mantiveram-se viáveis, sendo que 78 (96,3%) apresentaram todas as características morfológicas das espécies de *Fusarium*, mostrando que o método foi adequado para preservar culturas deste gênero.

Ao avaliar 70 culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* preservadas sob óleo mineral no período de 1923 a 1992 na Coleção de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz, Silva et al. (1994) observaram que o método não foi adequado para esta espécie, pois apenas 18 culturas permaneceram viáveis. Resultado semelhante foi obtido por Bezerra et al. (2006) ao analisarem 20 culturas de *Coccidioides immitis* preservadas sob óleo mineral na mesma coleção de culturas tendo apenas cinco culturas viáveis.

Lima e Borba (2001) avaliaram viabilidade, características morfológicas e capacidade dimórfica de culturas de *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e *Sporothrix schenckii* preservadas sob óleo mineral e em solo esterilizado no período de oito a 49 anos. Das 16 cepas de *B. dermatitidis* quatro estavam viáveis e foram capazes de concluir o processo dimórfico, enquanto que das 15 cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, todas mantiveram-se viáveis mas não foi possível realizar a autenticação taxonômica. Das 53 cepas de *S. schenckii*, 37 estão viáveis, 28 capazes de esporular, 12 concluíram o processo dimórfico e todas as culturas mantiveram-se viáveis em solo esterilizado.

Resultado semelhante foi obtido com *Blastomyces dermatitidis* e *Paracoccidioides brasiliensis* preservadas sob óleo mineral, onde mostraram incapazes de completar o dimorfismo após a reativação (Lima et al., 1991). Borba e Rodrigues (2000) constataram perda da capacidade de esporulação de 20 culturas de *Coelomyces* preservadas sob óleo mineral após 50 anos.

Braz et al. (2009), ao avaliarem 31 culturas de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral no período de 2 a 43 anos na Coleção de Culturas-Micoteca URM, observaram a manutenção das características morfológicas e a capacidade de produção enzimática. Vinte e seis (83,9%) culturas permaneceram viáveis, cinco (16,1%) inviáveis e 24 (92,3%) foram confirmadas taxonomicamente por apresentarem estruturas reprodutivas características de cada espécie.

A manutenção dos micro-organismos em culturas puras é de extrema importância para evitar a perda ou redução de suas propriedades fenotípicas, que podem ocorrer, por exemplo, por mutações. Dentre as técnicas de manutenção, estão à liofilização, a crioconservação, a conservação em parafina, glicerol ou sob óleo mineral com a realização de repiques periódicos e checagem de suas características (Colen, 2006; Bon et al., 2008).

## **2.2 *Aspergillus***

*Aspergillus* é um gênero anamorfo, que compreende entre 260 (Geiser et al., 2007, Samson; Varga 2009) e 837 espécies (Hawksworth, 2011). Estas espécies são classificadas em aproximadamente 10 gêneros diferentes teleomorfo (Geiser, 2009). Por exemplo, a *A. nidulans* é parte do gênero teleomorfo *Emericella*, enquanto que *A.*

*fumigatus* e *A. flavus* pertencem ao gênero *Neosartory* e *Petromyces*, respectivamente. Isso mostra que o *Aspergillus* é um grupo diverso de fungos.

Espécies de *Aspergillus* encontram-se entre os fungos mais abundantes em todo o mundo. Eles não são muito selectivos relativamente às condições abióticas de crescimento, podendo crescer ao longo de uma vasta gama de temperaturas (6-55°C) e uma humidade relativamente baixa. Além disso, a alimentação de espécies *Aspergillus* se dá numa grande variedade de substratos, incluindo fezes de animais e tecido humanos. No entanto, eles são encontrados predominantemente em complexo polímeros de plantase são considerados como tendo papel importânte na deterioração de alimentos (Bennett 2010).

O sucesso do gênero *Aspergillus* é também explicado por sua dispersão eficaz. Esporos deste gênero estão entre as mais dominantes estruturas fúngicas no ar, dispersando-se em curtas e longas distâncias (Bennett 2010).

Este gênero apresenta conidióforos eretos, simples, com uma vesícula dilatada, globosa ou clavada na sua extremidade; sobre a vesícula são formadas as fiálide primárias e/ou secundárias. Os conídios são hialinos, unicelulares, globosos e coloridos. As espécies *A. ochraceus* apresentam cabeças amareladas globosos e coloridos; *A. flavus* apresenta cabeça radial verde-amarela com esporos espinhosos e *A. parasiticus*, conidióforos menores que 500 µm, com cabeças verde-amareladas (Samson e Pitt, 1990). Dentre as espécies mais conhecidas encontram-se *A. flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fulmigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e *A. versicolor* (Slivinski, 2007; Hawksworth, 2011).

Muitas espécies de *Aspergillus* são utilizadas para obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos. Há espécies patogênicas para o homem, para outros animais e alguns podem produzir metabólitos tóxicos durante seu metabolismo (Rosa, Campos e Baroni, 2002).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são muito utilizados na biotecnologia. Espécies como *A. oryzae* é grande produtor de  $\alpha$ -amilases,  $\alpha$ -galactosidase e enzimas pectinolíticas (Shankar e Mulimani, 2007). O *A. niger* é importante na produção comercial das enzimas  $\beta$ -galactosidase, amiloglucosidase e pectinases (Liu et al., 2006). Botella et al. (2007) avaliaram a produção de xilanases e pectinases por *A. awamori*.

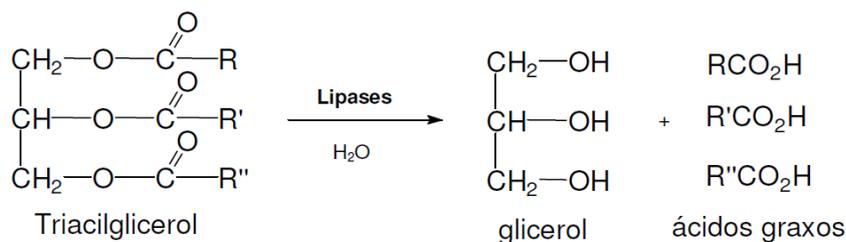
Inúmeras enzimas destes micro-organismos vêm sendo isoladas, purificadas e têm aplicabilidade nos mais diferentes ramos da indústria (Guimarães et al., 2007). Algumas espécies como *A. glaucus* e *A. repens*, são importantes agentes de deterioração de alimentos. Roux-Van der Merwe et al. (2005) estudaram o crescimento de diferentes espécies de fungos em efluentes industriais de petróleo e observaram a diminuição da DQO promovida por *A. niger*. Estudos feitos por Hamde e Abo-Tahon (2012) mostram que lipases produzidas por *A. terreus* var. *africanus* foi compatível com detergentes comerciais sendo uma espécie promissora para a indústria.

Viniegra-Gómez et al. (2003), selecionaram três linhagens de *A. niger* e observaram uma maior produção e atividade na fermentação em estado sólido comparado à fermentação submersa. Kronbauer et al. (2007) avaliaram a produção de xilanase por *A. caseiellus* induzida com bagaço de cevada em fermentação em estado sólido. A atividade enzimática da invertase tem sido caracterizada de forma significativa também em plantas e micro-organismos. Santos et al. (2012) testaram semente de abóbora para produção de lipases na fermentação em estado sólido utilizando *A. niger*, destacando sua importante produção com resíduos agroindustriais.

### 2.3 Lipases

As lipases (triacilglicerol éster hidrolase, E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que *in vivo* catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono), sendo a trioleína o seu substrato padrão, aos ácidos graxos correspondentes e glicerol (Figura 1), constituindo uma classe especial de carboxil éster hidrolases (Jaeger e Eggert, 2002; Diaz et al., 2006; Colla et. al, 2010).

As lipases *in vitro* também atuam como catalisadores em diversas reações, com alta especificidade, estabilidade e condições reacionais brandas, incluindo as reações de esterificação, transesterificação, lactonização, acilação regioesletiva e aminólise quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese (Krishna e Karanth, 2001; Gotor et al., 2002; Foresti e Ferreira, 2006).



**Figura 1.** Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol (Fonte: Diaz et al., 2006).

A utilização de lipases pelas indústrias apresenta vantagens como: estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, facilidade de separação dos produtos e, quando imobilizadas, podem ser submetidas às condições industriais típicas, com reatores a temperaturas superiores a 70°C por longos períodos de tempo (Hasan et al., 2006).

Devido à sua alta especificidade, estas enzimas são importantes na área de biotecnologia, principalmente nos setores oleoquímico e em síntese orgânica, na preparação de compostos enantiosseletivos. Apresentam muitas vantagens em processos de biotransformações, em função de sua grande afinidade por um largo espectro de substratos, versatilidade quanto às características do meio reacional (aquoso, orgânico ou supercrítico), atividade elevada em meio reacional livre de solventes e disponibilidade comercial (Pandey et al., 1999). Segundo Hasan et al. (2006), as lipases estão atraindo uma grande atenção devido às suas potencialidades biotecnológicas, pois constituem o mais importante grupo de biocatalisadores para aplicações neste campo.

As lipases podem ser aplicadas em inúmeras áreas, tais como: na indústria oleoquímica em processos como hidrólise, glicerólise e alcoólise; na indústria têxtil (melhoria da qualidade e propriedade dos tecidos) (Matsuoka et al., 2009); na indústria de detergentes (remoção de manchas de batom, frituras, manteiga, azeites, molhos, etc.) (Liu et al, 2008); na indústria de alimentos, na produção de ácidos graxos poli-insaturados (aditivos de alimentos) e na modificação de sabores (processo de fermentação de salame e vinho) (Hasan, Shah e Hameed, 2006), farmacêutica (Vieira et al., 2009), tratamento biológico de resíduos (Rosa et al., 2006), entre outras. No entanto, sua utilização é reduzida devido aos altos custos de produção, sendo sugerida como um fator de redução destes custos a utilização da fermentação em estado sólido como método de produção (Silva et al., 2005).

### 2.3.1 Lipases de origem microbiana

As lipases são encontradas em fontes animais, vegetais e microbianas. Sendo preferencialmente produzidas a partir de fontes microbianas, devido ao aumento da capacidade produtiva durante os processos fermentativos, facilidade de aquisição e controle, além dos baixos custos de obtenção (Saxena et al., 2003). Segundo Singh e Mukhopadhyay (2012), os micro-organismos mais utilizados para a produção de lipases são fungos filamentosos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Mucor*, e leveduras do gênero *Candida*.

Lipases microbianas vêm sendo alvo de estudos com o intuito de desenvolver novas tecnologias para otimizar os processos de modificação de óleos e gorduras catalisados por enzimas lipolíticas. Destacando entre esses, a imobilização da enzima utilizando diferentes tipos de suporte, estudos cinéticos e de estabilidade enzimática; modificações químicas, desenvolvimento de biorreatores, estudo da resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica, etc. (Costa e Amorim 1999; Dalla-Vechia et al., 2004; Mendes et al., 2005).

Essas enzimas apresentam amplo espectro de aplicações industriais, uma vez que são mais estáveis que as lipases animais e vegetais, além de poderem ser produzidas com menor custo, com alta velocidade de síntese, com grande versatilidade, e com maior simplicidade na manipulação ambiental e genética (Cihangir e Sarikaya, 2004; Ellaiah et al., 2004; Freire e Castilho, 2008). São extracelulares, em sua maioria, fato que facilita a extração, o isolamento e a purificação (Carvalho et al., 2003; Reis et al., 2009).

As lipases de origem microbiana são utilizadas em alimentos, na fabricação de detergentes (hidrólise de gordura), de cosméticos (remoção de lipídeos) e tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas). É enorme o potencial catalítico destas enzimas e, por isso, também são utilizadas como biocatalisadores ideais em química orgânica, na indústria farmacêutica, e na produção de aditivos alimentares (realçador de aroma) (Burkert et al., 2004; Cihangir e Sarikaya, 2004; Singh; Mukhopadhyay 2012).

Fungos filamentosos estão se destacando como produtores de lipases, como *Aspergillus niger*. Talvez, isso explique o fato de que, culturalmente, a maioria das aplicações das lipases se dê na área de alimentos, na qual se empregam fungos considerados GRAS (“Generally Regarded as Safe”) (Iwashita, 2002; Cihangir e

Sarikaya, 2004; Ellaiah et al., 2004; Contesini et al., 2009; Açikel et al., 2010). O uso histórico dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* na produção de alimentos e bebidas tradicionais, como queijos e saquê, elevam-os ao status GRAS (Iwashita, 2002; Contesini et al., 2009). Além desses gêneros, algumas importantes lipases fúngicas utilizadas comercialmente são obtidas dos gêneros: *Rhizopus*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium*. Dentre as leveduras, *Candida rugosa* é a que mais tem sido empregada em processos industriais (Cihangir e Sarikaya, 2004; Ellaiah et al., 2004).

As enzimas lipolíticas são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por Fermentação Submersa (FS) ou Fermentação em Estado Sólido (FES) usando espécies de micro-organismos, como por exemplo o fungo *Aspergillus niger* (Dalla-Vecchia et al., 2004). De acordo com Contesini et al. (2010), a maioria das lipases microbianas industriais são derivadas de fungos e bactérias. As enzimas lipolíticas microbianas são amplamente diversificadas nas suas propriedades enzimáticas, substrato e especificidade, o que as tornam muito atraentes para aplicações industriais (Hasan et al., 2006).

Devido à sua grande versatilidade e aplicabilidade há uma crescente procura de novas fontes de enzimas lipolíticas microbianas. Sendo o solo um grande reservatório de população microbiana diversificada, alguns pesquisadores como Lin et al. (1995) e Ko et al. (2005), vem utilizando desta inesgotável fonte de micro-organismos para a seleção dos mesmos quanto a capacidade de produzir enzimas lipolíticas. Em estudo para detecção de micro-organismos lipolíticos em solos, Ko et al. (2005), utilizando solo de uma fazenda localizada em Taiwa, observaram que a maior parte de produtores de enzimas lipolíticas foram as bactérias e os fungos, e que estes micro-organismos apresentaram boa atividade enzimática.

As enzimas microbianas são muitas vezes mais úteis do que as enzimas derivadas de plantas ou animais devido à sua grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, rendimentos elevados, a facilidade na manipulação genética e o rápido crescimento microbiano em um meio de baixo custo (Hasan et al., 2006; Contesini et al., 2010).

Os micro-organismos apesar da sua versatilidade são bastante sensíveis às condições do ambiente ao qual estão sendo submetidos. Na produção de enzimas lipolíticas microbianas, fatores como composição do meio, temperatura, pH, aeração e a presença de compostos inibidores influenciam no processo, afetando a atividade

enzimática. Uma grande variedade de micro-organismos tem habilidade de produzir essas enzimas, sendo função de alguns parâmetros reacionais e apresentando diferentes especificidades, massa molecular, sensibilidade à temperatura e pH (Burkert et al., 2003; Singh; Mukhopadhyay, 2012).

Segundo Hasan et al. (2006), apenas 2% dos micro-organismos do mundo são fontes de pesquisas. As manipulações genéticas ou ambientais tendem ao aumento do rendimento das células que por consequência acarreta em aumento da atividade enzimática, tornando a enzima de interesse constitutivo, ou seja, induzindo-a a produzir enzimas alteradas que possam ser facilmente empregadas (Jaeger et al., 1999).

O custo de produção das enzimas lipolíticas microbianas é determinado pela quantidade de enzima produzida, pelo processo de separação empregado e pela estabilidade enzimática. Dentre os vários fatores que influenciam a produção destas enzimas microbianas durante a fermentação, o substrato utilizado como fonte de carbono e o tipo de indutor tem relevância significativa. Isso acontece porque as enzimas lipolíticas têm como função quebrar os substratos lipídicos insolúveis para poderem ser mais facilmente absorvidos, visto que a maioria das enzimas microbianas são produzidas extracelularmente (Saxena et al., 1999; Kanwar et al., 2002; Singh; Mukhopadhyay, 2012).

### **2.3.2 Aplicações das lipases**

O interesse em pesquisas com lipases, principalmente de origem microbiana, tem crescido devido ao seu grande potencial biotecnológico. Como biocatalisadores, as lipases apresentam algumas vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos industriais. Efetivamente, suas características de especificidade, regioselectividade e enantioselectividade, permitem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Além disso, os processos enzimáticos requerem procedimentos mais fáceis e baratos, que utilizam temperatura e pressão ambientes, condições que minimizam a degradação de compostos lábeis e evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluente (Villeneuve et al., 2000; Castro-Ochoa et al., 2005; Silva et al., 2005;). Consequentemente, uma considerável atenção vem sendo dada ao uso das lipases em aplicações industriais.

A alta capacidade catalítica das lipases permite que estas enzimas sejam utilizadas na síntese regioseletiva ou na resolução estereosseletiva de alcoóis, ácidos carboxílicos e aminas, dando origem a produtos opticamente ativos e ampliando a aplicação comercial (Bon et al., 2008). O mercado industrial das lipases está dividido em três segmentos de aplicação: enzimas técnicas, enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal (Hasan et al., 2006).

Tecnologias como a recombinação gênica, a engenharia de proteínas e a evolução dirigida propiciaram a obtenção de enzimas com características (atividade, estabilidade, seletividade, especificidade) novas e mais dirigidas a substratos e condições de interesse industrial, promovendo a expansão da aplicação de enzimas. Entre as maiores empresas produtoras de enzimas estão a Amano Pharmaceuticals (Japão), Novozyme (Dinamarca), Genencor International (USA), Unilever (Holanda), Biocatalysts (Inglaterra) e Meito Sankyo (Japão) (Krishna, 2002).

O uso de lipases como aditivos em detergentes ainda representa a maior aplicação industrial destas enzimas. Entretanto, a capacidade hidrolítica das lipases tem sido explorada em vários outros campos de atividade, como, por exemplo, na indústria de papel e celulose, para remoção de material hidrofóbico como triacilgliceróis e ceras que são indesejáveis na manufatura deste produto, no tratamento de águas residuárias de fábricas, restaurantes e residências, na indústria farmacêutica, de couro, têxtil e de cosméticos (Reis et al., 2009).

As lipases são utilizadas no tratamento de resíduos domésticos, na limpeza de tubulações de esgotos, fossas sépticas e sumidouros e também para acelerar a biodegradação de polímeros e lamas de perfuração de poços de petróleo contendo ésteres sintéticos emulsionados em água (Jaeger e Reetz, 1998; Bon et al., 2008). Por outro lado, as lipases também podem ser empregadas como biossensores para a detecção de triacilgliceróis na indústria oleoquímica, na tecnologia de alimentos e em análises clínicas (Bon et al., 2008).

Na indústria alimentícia, as lipases são utilizadas nos seguintes sub-grupos: melhoramento da textura de pães, otimização do tempo de maturação de salsichas fermentadas, na hidrólise de gorduras do leite e até para alterar o sabor do leite (Bon et al., 2008; Gandra et al., 2008). Shin; Akoh; Lee (2010) utilizaram lipases na interesterificação de triacilgliceróis da manteiga com óleo de palma, reduzindo o teor de gordura saturada, sem produzir gordura trans. Alim e colaboradores (2008)

utilizaram lipase para obter gordura com maior ponto de fusão pela reação entre estearina (18:0), ácida linoleico (18:2) e óleo fracionado de farelo de arroz.

Segundo Pandey et al. (2000), a partir da década de 90, houve um aumento no interesse em relação à fermentação em estado sólido na produção de lipases para o desenvolvimento de bioprocessos, tais como a biorremediação e biodegradação de compostos, desintoxicação biológica de resíduos agroindustriais, biotransformação e enriquecimento nutricional de culturas e de resíduos de culturas, obtenção de produtos com grande valor agregado, tal como metabólitos secundários biologicamente ativos.

## **2.4 Fermentação em Estado Sólido (FES) para produção de enzimas**

Existem dois tipos básicos de fermentação para produção de enzimas e outros metabólitos: Fermentação Submersa (FS) e Fermentação em Estado Sólido (FES). Na FES, o micro-organismo cresce em substratos sólidos umedecidos ou suportes inertes, na ausência (ou quase) de água livre, e na FS, os substratos são dissolvidos em meio líquido. No caso da FES, o micro-organismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do substrato, consumindo-o e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas (Mitchell et al., 2006). O material sólido é insolúvel e age como suporte físico e como fonte de nutrientes. Este material poderá ser um substrato sólido natural, como resíduos da agricultura, ou um suporte inerte, como poliuretano ou resinas poliméricas (Pandey, 2003).

Como a fermentação em estado sólido é a fermentação na ausência de água livre, a recuperação de seus produtos requer a extração do sólido do meio fermentado. Um extrator comum é a água destilada ou deionizada. Outros extratores tem sido utilizados, como uma solução de Cloreto de Sódio (NaCl) 1% para protease e tampão succinato 0,02 M para lipases e proteases (Aikat e Bhattacharyya, 2000). No processo de FES deve-se levar em consideração alguns aspectos importantes, como a seleção do micro-organismo, a escolha do substrato, a otimização dos parâmetros do processo, o isolamento e a purificação do produto, dentre outros fatores. A FES reproduz processos microbiológicos naturais. No caso de aplicações industriais, estes processos naturais, se monitorados, produzem o produto desejado (Couto e Sanromán, 2006). Assim, vários produtos de valor agregado têm sido produzidos por esta técnica

fazendo uso de matérias-primas provenientes da natureza (Pandey, Soccol e Mitchell, 2000).

As enzimas e outros metabólitos microbianos são tradicionalmente obtidos por processos de FS. Neste tipo de fermentação, além de um melhor controle do processo, a recuperação de enzimas extracelulares e a determinação de biomassa são facilitadas, sendo realizadas por filtração simples ou centrifugação para a remoção das células. O sobrenadante da cultura é utilizado para os estudos enzimáticos e o crescimento microbiano é quantificado após secagem da biomassa, por gravimetria, podendo ainda ser realizado por densidade ótica no caso de cultivos com bactérias (Lima et al., 2003). Entretanto, na FES, onde os teores de água não são superiores a 80%, pode apresentar algumas vantagens em relação à FS. Os metabólitos são normalmente produzidos em uma forma concentrada, facilitando o seu processo de recuperação do meio de fermentação. Uma vantagem adicional da FES, em relação às FS é o custo porque, além da simplicidade e economia do processo em termos de espaço, meio, equipamentos e energia (Mitchell et al., 2006), utiliza como matéria-prima, resíduos descartados pela indústria, causando diminuição no impacto poluente (Singhania et al., 2009).

Além de uma boa escolha sobre qual tipo de fermentação utilizar, faz-se necessário uma avaliação sobre o meio de cultura utilizado para o crescimento microbiano. Os meios de cultivo são formulados com compostos quimicamente conhecidos ou de matérias-primas naturais. Os constituintes principais desses meios são fontes de carbono (energia), fontes de nitrogênio, substâncias minerais, fatores de crescimento, e se tratando da produção de enzimas é essencial à presença de um indutor (Lima et al., 2007).

O controle da umidade, da temperatura e do pH do meio, a velocidade e a frequência de agitação, as condições de transferência de oxigênio e de nutrientes, as características do substrato, além de características e estimativas de crescimento da automação do processo são os parâmetros mais frequentemente analisados em diversos estudos revistos (Schmidell, et al. 2001, Messias et al., 2011).

Este tipo de fermentação tem mostrado também um enorme potencial tecnológico no que diz respeito ao desenvolvimento de produtos que apresentam componentes derivados de micro-organismos como rações para animais, produtos para a indústria alimentícia, química e farmacêutica. Estas aplicações envolvem a

biotransformação de produtos e resíduos agrícolas para enriquecimento nutricional, produção de biomassa e formação de produtos com alto valor agregado, como metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo antibióticos, alcalóides, enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, micro-pesticidas e bioerbicidas, biosurfactantes, biocombustíveis, compostos aromáticos, etc. (Pandey, Soccol e Mitchell, 2000; Messias et al., 2011).

O crescimento dos fungos nos processos fermentativos está relacionado à disponibilidade de substâncias que os satisfaçam nutricionalmente e de condições favoráveis como concentração das fontes de carbono e de nitrogênio, pH do cultivo, temperatura de crescimento e concentração de oxigênio dissolvido. Muitos estudos têm tratado da otimização de meios de cultura, em processos fermentativos, para a produção de determinada substância de interesse (Burket et al., 2004; Freitas et al., 2007; Contesini et al., 2009; Açikel et al., 2010; Rigo et al., 2010).

Na produção de enzimas por FES, a quantidade reduzida de água no substrato limita o número de micro-organismos, sendo que os mais utilizados são os fungos filamentosos, devido a sua capacidade de tolerar ambientes com baixa quantidade de água, utilizando resíduos da agroindústria (Couto e Sanromán, 2006; Messias et al., 2011).

#### **2.4.1 Produção de lipases por fungos filamentosos utilizando a FES**

Estudos de FES para produção de lipases vem sendo reportados na literatura utilizando principalmente fungos filamentosos e leveduras (Tabela 1), sendo citados *Penicillium candidum*, *P. camembertii*, *Mucor miehei*, *Monascus fuliginosus*, *Rhizomucor pusillus* e *R. rhizopodiformis* utilizando bagaço de cana (Cordova et al., 2006), *Aspergillus niger* utilizando torta de gergelim (Kamini; Puvanakrishnan, 1998); *Penicillium brevicompactum* utilizando torta de babaçu e castor meal (Silva et al., 2011), *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja (Di Luccio et al., 2004), *Aspergillus oryzae* utilizando torta de óleo de coco (Ramachandran et al., 2004).

**Tabela 1.** Principais micro-organismos envolvidos na produção de lipases por Fermentação em Estado Sólido (FES).

Microorganismos	Substrato	Referências
<i>Aspergillus oryzae</i>	torta de óleo de coco	Ramachandran et al., 2004.
<i>Aspergillus niger</i>	torta de gergelim farelo de trigo semente de abóbora	Kamini et al., 1998. Mahadik et al., 2002. Santos et al., 2012
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Farelo de soja	Vargas et al, 2008.
<i>Penicillium verrucosum</i>	bagaço-de-cana	Kempka et al., 2008
<i>Penicillium brevicompactum</i>	torta de babaçu	Silva et al., 2011
<i>Penicillium simplicissimum</i>	torta de soja	Di Luccio et al., 2004.
<i>Rhizopus oligosporus</i>	torta de amêndoa	Ul-Haq et al., 2002.
<i>Rhizopus homothallicus</i>	bagaço-de-cana	Diaz et al., 2006.
<i>Rhizopus rhizopodiformis</i>	bagaço-de-cana	Cordova et al., 2006.

#### 2.4.2 Fatores que afetam a produção enzimática por FES

As condições ambientais como umidade, temperatura, pH afetam significativamente o crescimento celular e a formação de produto. Os processos de FES necessitam das seguintes etapas: seleção cuidadosa da matéria-prima ou substrato, escolha de um micro-organismo específico, controle dos parâmetros da fermentação, separação em alguns casos e a purificação dos produtos (Gutierrez et al., 1998).

A água representa um papel primordial na FES, pois é responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular. O teor de umidade do meio de cultivo é um dos principais parâmetros que influencia a FES. A natureza do substrato, as necessidades do micro-organismo utilizado e o tipo de produto final desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá apresentar (Pandey, 2003).

O crescimento microbiano é um processo exotérmico, e o calor gerado deve ser dissipado, visto que altas temperaturas não são favoráveis ao crescimento dos micro-organismos. No início da fermentação, tanto a temperatura como a concentração de oxigênio, são os mesmos em qualquer ponto do leito. No entanto, com o progresso da fermentação, o oxigênio se difunde, permitindo que as reações metabólicas aconteçam, fato que, por sua vez, libera calor, o qual não é facilmente dissipado devido à baixa condutividade térmica do substrato e a dificuldades na condução através do leito da fermentação. Pode-se contornar este problema com a introdução de ar comprimido

através do meio de cultura, para produções industriais, controle de temperatura da sala ou do equipamento onde ocorre a fermentação, ou pelo sistema de camisas em torno do biorreator com circulação de água refrigerada (Schmidell et al., 2001).

O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada micro-organismo, geralmente os fungos preferem pH baixo (4,5 – 6,0). O pH do meio afeta o metabolismo dos micro-organismos por alterar seu conjunto enzimático. O controle do pH durante a FES, embora seja um dos parâmetros mais críticos, dificilmente será conseguido devido à heterogeneidade e consistência do material. Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (Schmidell et al., 2001; Pandey, 2003).

Estudos de Pera et al. (2006), relatam que o pH ótimo de atividade de *Aspergillus niger* está em torno de 6,0. Cai et al. (2009) ao realizarem a purificação e caracterização parcial da lipase produzida por *Geotrichum* sp., observaram que a enzima foi estável entre pH 3,0-8,0. Lipases microbianas são mais estáveis na gama de pH de 2 a 10,5 (Singh; Mukhopadhyay, 2012). Saxena et al. (2003) relatam que a temperatura ótima da lipase de *Aspergillus carneus* foi 37°C, diferindo dos resultados obtidos nesse estudo, uma vez que a temperatura ótima para a atividade de lipases produzidas por *Aspergillus candidus* foi 65°C. Dantas e Aquino (2010), avaliaram a influência do teor de água dos substratos, entre 35% e 65%, na produção de lipase através da FES. Onde verificou-se que houve maior produção de lipase quando empregado cascas de abacate (10 U/gss) e sementes de abóbora (24 U/gss) com teor de água de 35% e torta de babaçu (25 U/gss) e borra de café (13 U/gss) com teor de água de 45%. Quando utilizado torta de mamona como substrato obteve-se máxima atividade enzimática (19 U/gss) nos resíduos contendo teor de água de 35% e 45%. O controle de determinadas variáveis se faz necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes (Messias et al, 2011).

## **2.5 Substratos utilizados na FES**

Comumente utilizam-se produtos ou subprodutos oriundos da agroindústria, que tem como característica servir de matriz sólida e fornecer fontes de carbono e de energia para o crescimento do micro-organismo, além de apresentarem um custo

relativamente baixo. Pode-se também incorporar solução nutriente ao substrato, com o intuito de adequá-lo às condições nutricionais do microorganismo (Schmidell et al., 2001).

O material sólido utilizado em FES é, geralmente, fragmentado e de natureza granular ou fibrosa que permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade. A quantidade de água presente varia consideravelmente de acordo com o material utilizado. Os substratos amiláceos (arroz, trigo, centeio, cevada, milho, mandioca) são, na maioria das vezes, fermentados entre 25 e 60% de umidade inicial. No entanto, os substratos celulósicos (palhas, cascas, bagaço, farelos e outros) permitem trabalhar com teores de umidade mais elevados 60 a 80% sem o aparecimento de água livre (Soccol e Vanderberghe, 2003).

Para a produção industrial de enzimas microbianas, os micro-organismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; produzirem a enzima em velocidade elevada, constante e em curto espaço de tempo; os métodos para a recuperação devem ser simples; a preparação enzimática obtida deve apresentar estabilidade. O êxito da produção industrial de enzimas depende do grau em que a atividade dos micro-organismos é alcançada e quando se reduzem custos do substrato empregado, da incubação e da recuperação da enzima (Slivinski, 2007).

A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos disponibiliza substratos alternativos e colabora em resolver problemas relacionados à disposição inadequada de resíduos sólidos (Maróstica e Pastore, 2005).

Existem vários exemplos na literatura relacionando o uso de substratos naturais e suportes inertes na produção de enzimas e outros compostos de alto valor comercial por FES. Os principais resíduos que podem ser utilizados são as tortas derivadas dos processos de extração do óleo de milho (torta de milho), óleo de girassol (torta de girassol) e soja (torta de soja), materiais abundantes no Brasil, e que normalmente oferecem um potencial poluente muito elevado (Slivinski, 2007).

Vários resíduos agrícolas têm sido relatados como eficazes para produção de lipase: farelos (trigo, arroz, soja, cevada), tortas (soja, oliva, gergelim, babaçu) e bagaço (de cana) (Singhania et al., 2008). A utilização de subprodutos agroindustriais como substrato na produção de lipases, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado pode vir a reduzir em muitos o preço final da enzima (Castilho et al., 2000).

Na maioria dos casos, a produção de lipases utilizando resíduos fibrosos requerem suplementação nutricional ou uma mistura de mais do que um substrato. Colla et al. (2010) mostraram que uma mistura de farelo de soja e casca de arroz teve efeito sinérgico na produção de lipase. Outros resíduos como farelo de trigo (Contesini et al., 2009), resíduo de mamona (Godoy et al., 2011; Herculano et al., 2011), torta de babassu (Silva et al., 2011) são relatados como bons substratos para a produção lipásica. Estes representam somente uma pequena proporção dos substratos que podem ser utilizados na produção de metabólitos com aplicação industrial (Mahadik et al., 2002; Ul-Haq et al., 2002; Cammarota e Freire, 2006).

### 2.5.1 Licuri

O licuri, *Syagrus coronata* (Mart.) Becc., é uma palmeira encontrada a leste do rio São Francisco, nos estados de Pernambuco, Alagoas, Bahia, Sergipe e norte de Minas Gerais, na caatinga e florestas semidecíduas, zonas de transição para restinga e cerrado. É regionalmente conhecido como licurizeiro, licurí, ouricuri, auricuri, alicuri, nicuri, dicorí, uricuri, coqueiro dicori e coqueiro cabeçudo (Drumond, 2007). Possui estipe não perfilhado de 3-10 metros de altura e 15-25 cm de diâmetro. Não há entrenós visíveis em seu estipe retangular. Possui cinco fileiras de folhas com fibras grossas, chatas na bainha. Seus frutos são elipsóides, amarelados, também amarronzados, de 2,5 a 3,0 cm de comprimento, com mesocarpo suculento adocicado (Lorenzi, 2010) (Figura 1).

Segundo Drumond (2007) o licuri inicia sua frutificação seis anos após o plantio. Um licurizal nativo produz em média 2.000 Kg/ha de frutos anualmente. Nos anos de pluviosidade abaixo da média, a produção diminui, mas sempre ocorre de maneira estável. Sendo bem cuidado (podando as folhas velhas, capinando as plantas daninhas ao seu redor), um licurizal pode produzir 4.000 Kg/ha.

O fruto, quando verde, aferventado fornece amêndoas saborosas para fazer cuscuz, iguaria típica da culinária nordestina. Os brotos do licuri são consumidos pelos sertanejos, sendo a parte mais mole cozida, e a parte mais dura triturada, moída e utilizada como farinha. Ele é conhecido como a “árvore salvadora da vida” nas áreas de ocorrência natural (Drumond, 2007).



**Figura 2.** Partes da palmeira licuri (*Syagrus coronata*): folha (A); caule (B); flor (C); fruto (D).

É uma palmeira ornamental, podendo ser utilizada como paisagismo. Suas folhas fornecem cera; o palmito, mesocarpo e amêndoa de seus frutos são comestíveis. Ainda as amêndoas produzem óleo para fabricação de sabão e o endocarpo utilizado para artesanato. Frutificação ocorre no verão (Lorenzi, 2010).

Por compor a caatinga, onde os grandes períodos secos se alternam com as estações chuvosas, esta palmeira suporta bem as secas prolongadas e floresce e frutifica por um longo período do ano, fornecendo recursos para a subsistência da população dessas regiões (Figura 2A), sendo utilizado também para alimentar os animais domésticos (Lorenzi, 2010).

Ressalta-se a particular importância desta palmeira para a arara-azul-de-Lear (*Anodorhynchus leari* Bonaparte, 1856) (Figura 2B), posto que seus frutos se constituem no seu principal item alimentar (Ramalho, 2008). Esta ave, endêmica da Ecorregião do Raso da Caatinga, encontra-se extremamente ameaçada de extinção, devido ao tráfico (Rocha, 2009) e a escassa oferta de alimentos da vegetação nativa local. Encontra-se, portanto, em situação de elevado risco, encontrando-se na lista Oficial da Fauna Silvestre Brasileira Ameaçada de Extinção (MMA, 2003). Denota-se assim que ações de conservação da arara-azul-de-Lear devem ser baseadas necessariamente na recuperação das populações nativas da palmeira licuri (IBAMA, 2006; CEMAVE, 2012).



Fonte: [www.flickr.com](http://www.flickr.com)

**Figura 3.** Principais consumidores do licuri: colhedora (A); arara-azul-de-Lear (B).

Todas as partes do licuri são utilizáveis. Das folhas, são produzidos sacolas, chapéus, vassouras e espanadores. Com a raspagem das folhas é obtido a cera de licuri que é equivalente a da carnaubeira, utilizada para fabricar de papel carbono, graxa para sapatos, móveis e pintura de automóveis. A polpa das amêndoas é consumida *in natura*, sendo utilizadas para fabricação de cocadas. Delas também é extraído um óleo usado na culinária da população do semi-árido (Ramalho, 2008). O óleo de licuri na Bahia, mais precisamente nas comunidades do Senhor do Bonfim e Caldeirão Grande, é industrializado e utilizado para produção de saponáceos (sabão em pó, detergentes, sabão em barra e sabonetes finos) considerados de alta qualidade, visto que o licuri é considerado o melhor óleo brasileiro para a produção de sabão (Ramalho, 2008) (Figura 3).



Fonte: [www.trollada.com.br](http://www.trollada.com.br)

**Figura 4.** Produtos comercializados originados do licuri: óleo de licuri (A); licuri em conserva (B); cestas feitas com a palha da palmeira (C).

Para a extração do óleo de licuri, as mulheres das comunidades do Senhor do Bonfim e Caldeirão Grande, Bahia, catam na mata os coquinhos de licuri depois separam os melhores e maiores para a extração do óleo. Os pequenos que sobram passam pela trituradora forma o que se chama torta do licuri o qual compõe uma rica ração para animais. Depois de separados, são quebrados manualmente onde são retiradas as amêndoas e em seguida torradas. Após esse processo, as amêndoas já torradas vão para a trituradora onde será obtida uma massa. Essa massa triturada vai para o fogo junto com água quente, mexendo sempre até o óleo começar a ferver. Depois é colocado em um recipiente para a decantação do óleo o qual voltará ser submetido a uma segunda fervura. Após a segunda fervura, o óleo está pronto (Escola Umbuzeiro, 20012) (Figura 5).



Fonte: www.escolaumbuzeiro.org

**Figura 5.** Processo de extração do óleo de licuri.

A determinação da composição nutricional indicou que o fruto é altamente calórico. Os principais constituintes das amêndoas são lipídeos e proteínas (Tabela 3), na polpa, o  $\alpha$ -caroteno é um importante constituinte (Crepaldi et al., 2001).

**Tabela 2.** Composição química da polpa e da amêndoa do fruto de licuri (*Syagrus coronata*).

Parâmetros analisados	Média e desvio padrão	
	Polpa	Amêndoa
Composição centesimal		
Umidade (%)	77,4 $\pm$ 0,16	28,6 $\pm$ 0,38
Cinzas (%)	1,4 $\pm$ 0,06	1,2 $\pm$ 0,01
Lipídios (%)	4,5 $\pm$ 0,3	49,2 $\pm$ 0,08
Nitrogênio (%)	0,5	2,2 $\pm$ 0,01
Proteínas (%)	3,2	11,5 $\pm$ 0,03
Carboidratos totais (%)	13,2	9,7
Composição vitamínica		
xantofila	traços	*nd
$\alpha$ -caroteno	traços	nd
$\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	26,1 $\pm$ 0,7	nd
valor pró-vitamina A (ER)	4,4 $\pm$ 0,1	nd
$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	3,8 $\pm$ 0,4	nd
ácido ascórbico	traços	nd
Valor calórico (Kcal.100 g <sup>-1</sup> )	108,6	527,3

Fonte: Crepaldi et al (2001) /\* nd= não detectado

A torta de licuri é originada do resíduo obtido da extração do óleo e serve como excelente alimento para animais, especialmente para vacas leiteiras. A torta é constituída de 41% de substâncias não azotadas, 19% de proteínas, 16% de celulose e 11% a 12% de óleo (Santos et al., 2006).



Fonte: coisasdeumachef.blogspot.com

**Figura 6.** Torta de licuri.

O Brasil, em função do seu tamanho e diversidade de clima, solo e flora, dispõe mais de 200 espécies de oleaginosas que podem ser utilizadas na produção de biodiesel (Beltrão, 2006). O licuri além de suas diversas utilidades, e com o advento do biodiesel, vem despertando grande interesse por parte dos produtores rurais do sertão nordestino em manejar seus povoamentos naturais e até mesmo em estabelecer novos plantios para fins de produção de biodiesel.

A maioria das palmeiras brasileiras não está ameaçada de extinção. Porém devido ao uso desordenado dos povos indígenas locais, para artesanato do licuri, esta palmeira esta extinta em Águas Belas, no sertão de Pernambuco e municípios vizinhos (Rufino, 2008).

## CAPÍTULO 1

### **SELEÇÃO DE ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS* PARA PRODUÇÃO DE LIPASES UTILIZANDO FARELO DE LICURI, *SYAGRUS CORONATA* (MARTIUS) BECCARI.**

---

Trabalho a ser submetido como Farias, C.M.M., Sousa, M. A., Souza, O. C., Magalhães, O.M.C., Medeiros, E. V., Moreira, K.A., Souza-Motta, C. M.. Seleção de espécies de *Aspergillus* para produção de lipases utilizando farelo de licuri, *Syagrus coronata* (Martius) Beccari, como substrato. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

## Resumo

*Espécies de Aspergillus vem sendo objeto de estudos devido às suas múltiplas aplicações em escala industrial como na produção de alimentos, detergentes, cosméticos e fármacos, pois possuem capacidade de produzir lipases normalmente extracelulares. A grande demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características tem estimulado a busca de novas cepas de microrganismos lipolíticos, principalmente de fungos. O objetivo deste trabalho foi selecionar culturas de Aspergillus preservadas sob óleo mineral na Micoteca-URM quanto à produção de lipases utilizando substrato de baixo valor comercial. A caracterização qualitativa foi realizada em placa de Petri utilizando Tween 20 como substrato e a qualitativa em fermentação em estado sólido utilizando farelo de licuri como fonte de carbono. No teste qualitativo nenhuma cultura apresentou halo de degradação, entretanto em fermentação em estado sólido todas as culturas produziram lipases com atividades que variaram de 74,33 a 197,44 U/gss. A. candidus URM5611 apresentou a maior atividade lipolítica com 197,44 U/gss, após 48 horas de fermentação. A lipase de A. candidus apresentou melhor atividade em pH 2,5 e 65°C. A capacidade da lipase de A. candidus ser estável em uma ampla faixa de pH (2,5–9,0) e temperatura (30–65°C) sugere o uso desta cepa em processos biotecnológicos industriais.*

**Palavras-chave:** *Aspergillus*, farelo de licuri, lipases.

## Introdução

As lipases (glicerol ester hidrolases, E.C. 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atua geralmente na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise e a síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (Sharma et al., 2001; Treichel et al., 2010).

A função biológica destas enzimas é primordialmente catalisar a hidrólise de triglicerídeos insolúveis para gerar ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis e glicerol. Entretanto, em condições em que a disponibilidade de água no meio é reduzida, a maioria das lipases pode exercer sua atividade catalítica reversa, catalisando também reações de esterificação e transesterificação, entre outras. Assim, devido às diferentes reações que são capazes de catalisar e às suas características de região e enâncio seletividade, as lipases, além de sua utilização em áreas tradicionais, como a indústria de detergentes e alimentícia, vêm sendo intensamente empregadas nos mais diversos campos: indústria farmacêutica, de química fina, oleoquímica, de couros, de polpa e papel e no tratamento de resíduos industriais (Freire e Castilho, 2000; Sharma et al., 2001; Messias et al., 2011).

As lipases são encontradas na natureza em animais, vegetais e microrganismos. O interesse pelas lipases microbianas tem crescido muito devido principalmente à sua maior estabilidade e diversidade quando comparadas a lipases de outras fontes. Assim, a descoberta de novas lipases, a partir da seleção de microrganismos, com características desejáveis (estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, alta especificidade em relação a certos ácidos graxos e enâncio seletividade), pode guiar promissoras perspectivas científicas e comerciais (Björkling et al., 1991; Cotensini et al, 2010).

Apesar de tradicionalmente produzir-se enzimas por meio da fermentação submersa pela maior facilidade de controle do processo, a fermentação em substrato sólido (FSS) apresenta vantagens em relação à primeira (Santos et al., 2006). Entre essas pode-se destacar: o meio de cultura é mais simples e barato, geralmente constituído por resíduos de produtos agrícolas não refinados (por exemplo, palhas, bagaços), que muitas vezes são até descartados pelas indústrias de beneficiamento agrícola; menor produção de resíduos resultante do processo fermentativo; menor utilização de água, o que evita inclusive a contaminação por bactérias que geralmente requerem maior quantidade de líquido no meio; menor demanda de energia; facilidade na aeração do meio, havendo maior difusão de gases; possibilidade de produção de esporos, impossíveis de se obter por fermentação submersa (Hölker et al., 2004). Dentre as alternativas existentes a fim de diminuir estes custos, está o emprego de resíduos agroindustriais a FES, o qual se mostra uma fonte riquíssima de substratos para aplicação neste processo (Murugan et al., 2011).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a seleção de isolados de *Aspergillus* produtores de lipase utilizando fermentação no estado sólido para posterior otimização do meio de cultivo e das condições de cultivo a fim de produzir um biocatalisador a custos reduzidos.

## **Metodologia**

### **Micro-organismos**

Foram utilizadas para a verificação da viabilidade e autenticação taxonômica 18 espécies de *Aspergillus* preservadas sob óleo mineral (Sherf, 1943) estocadas desde

2007 na Coleção de Culturas - Micoteca URM do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

### **Caracterização morfológica**

As culturas de *Aspergillus* foram reativadas e autenticadas taxonomicamente. Os esporos das culturas foram suspensos em 1,0 mL de uma solução contendo 0,2 % de ágar e 0,05 % de Tween 80. Desta suspensão, 2,0 µL foram inoculados em três pontos das placas de Petri contendo 25 mL de CZ e MEA. As culturas foram incubadas durante sete dias, no escuro, a 25 °C e, em seguida, as características morfológicas como o diâmetro e a cor das colônias, tipo de vesícula, seriação (uni ou biseriado) do conidióforo, a morfologia e ornamentação da parede dos conídios, serão analisadas e comparadas com chaves taxonômicas e guias disponíveis para o gênero *Aspergillus* (Raper e Fennell, 1965; Klich, 2002; Samson et al., 2007).

### **Seleção de culturas de *Aspergillus* produtoras de lipases**

#### **Seleção em meio sólido**

Fragmentsos de culturas de *Aspergillus* foram inoculados no centro da placa de Petri, contendo Batata Dextrose Ágar (BDA) a 28°C. Após sete dias de crescimento foram retirados discos de 5 mm de diâmetro e transferidos para o centro da placa de Petri com meio de cultura, em triplicata, proposto por Sierra (1957), contendo peptona (10g/L), cloreto de sódio (5g/L), cloreto de cálcio (2g/L), ágar (20g/L), Tween 20 (10mL/L), ajustado o pH para 7,4. As culturas foram incubadas em BOD (Biochemical Oxygen Demand) (TECNAL TE424, Brasil) a 28°C e 37°C ± 2°C, observadas durante 24, 48, 72 e 96 horas, evidenciando-se um halo claro em torno das colônias indicativo de atividade lipolítica. O Índice Enzimático (IE) foi expresso pela medida da relação entre o diâmetro do halo e o diâmetro do crescimento da colônia segundo Hankin e Anagnostakis (1975). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **Seleção por fermentação em estado sólido (FES)**

As fermentações foram realizadas em frascos tipo Erlenmeyers de 250 mL, contendo 10 g de farelo de licuri, óleo de oliva como indutor a 1%, umedecido com tampão fosfato 0,1 mol/L mantido a umidade inicial de 50%, pH 7,0. Os frascos foram autoclavados, resfriados e inoculados com 1 mL da suspensão de esporos na concentração de  $5 \times 10^8$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  e incubados  $30^\circ\text{C}$  em estufa BOD por até 96 horas (Sabu et al., 2005).

Após 96h, foram retirados três frascos para a obtenção do extrato bruto e dosagem da atividade enzimática. Em cada frasco foram adicionados 50 mL de água destilada esterilizada com 0,01% de Tween 80 e mantidos em agitador rotativo (Shaker TECNAL) a 150 rpm durante 10 minutos. O substrato fermentado foi submetido à filtração seriada usando gaze estéril e papel de filtro (CELAB 22,15 micra) com o auxílio de uma bomba a vácuo. Os filtrados foram considerados como extrato bruto, distribuídos em tubos Falcon de 50 mL e preservados em  $4^\circ\text{C}$  (Sabu et al., 2005).

### **Atividade enzimática**

A atividade enzimática foi realizada pelo método titulométrico, utilizando óleo de oliva (10% m/v) como substrato para dosagem da enzima, o qual foi emulsionado com goma arábica (5% p/v) em água destilada. A 5 mL desta emulsão foi adicionado 1 mL do extrato enzimático bruto, incubados por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ , posteriormente titulados com uma solução de NaOH (0,05 M) segundo Watanabe et al. (1977). A dosagem da atividade lipásica foi realizada utilizando fenolfitaleína como indicador e a média aritmética dos valores foi utilizada para determinação do cálculo da atividade enzimática. Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima que libera  $1 \mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima que pode ser determinada através da equação segundo Leal (2002).

$$AL = \frac{V_1 \cdot M \cdot fc \cdot 1000}{V_2 \cdot t}$$

**AL = Atividade lipásica (U/mL)**

**V<sub>1</sub> = Volume da amostra titulada**

**M = Molaridade da solução de NaOH**

**fc = Fator de correção do NaOH**

**V<sub>2</sub> = Extrato enzimático**

**t = Tempo**

A unidade de cada amostra foi determinada segundo a metodologia da Association of Analytical Communities - AOAC (2003), para posterior conversão dos resultados para substrato seco.

### **Efeito e estabilidade do pH na atividade enzimática**

O efeito do pH foi determinado por determinações da atividade enzimática a 50°C, do extrato enzimático bruto emulsionado por três minutos com goma arábica (5% p/v) com óleos de oliva em diferentes pH, utilizando os tampões: Citrato-fosfato 0,05M pH 2,5 a 7,0 e Tris-HCL 0,05M pH 7,4 a 9,0 com variação de 0,4 pontos. Para determinação da estabilidade da enzima à temperatura, o extrato enzimático foi previamente incubado a temperaturas de 30° a 80°C com variação de 1 hora e em seguida foram submetidas à determinação da atividade lipolítica. As análises foram realizadas em triplicata.

### **Efeito e estabilidade da temperatura na atividade enzimática**

O efeito da temperatura foi determinado a constante pH 2,5 ótimo, pela incubação do extrato enzimático com o respectivo substrato, com variações de temperatura entre 30 a 80°C, com uma faixa de variação de 5°C, por um período de 60, 120 e 180 min. A atividade enzimática foi realizada como descrita anteriormente. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Para determinação da estabilidade da enzima ao pH o extrato enzimático foi previamente submetido à ação de diferentes valores de pH pelo uso das soluções tampões, com pH variando entre 2,5 a 9,0 por um período de 60, 120 e 180 min e em seguida foram submetidas à

determinação da atividade lipolítica como descrita anteriormente. As análises foram realizadas em triplicata.

## Resultados e discussão

### Viabilidade e autenticação taxonômica das culturas de *Aspergillus*

Todas as espécies testadas estão mantidas na Coleção de Culturas - Micoteca URM sob óleo mineral, após reativadas preservaram suas características morfológicas (Tabela 1). As culturas de *Aspergillus* apresentaram colônias de coloração variada de acordo com características de cada espécie, com texturas que variam de rugosas a pulverulentas, hifas hialinas, vesículas globosas a subglobosas, seriação uni e bisseriada (Figura 1).

O método de preservação sob óleo mineral apresentou-se adequado para a manutenção de culturas de *Aspergillus*, uma vez que manteve a viabilidade das mesmas, com estabilidade das características morfofisiológicas após estocagem por até 5 anos, sendo que estes resultados concordam com Braz et al. (2009) que avaliaram a viabilidade de 31 isolados de *Acremonium*, onde 26 mantiveram-se viáveis quando preservadas sob óleo mineral na Micoteca URM e 24 foram autenticados taxonomicamente após 31 anos de preservação.

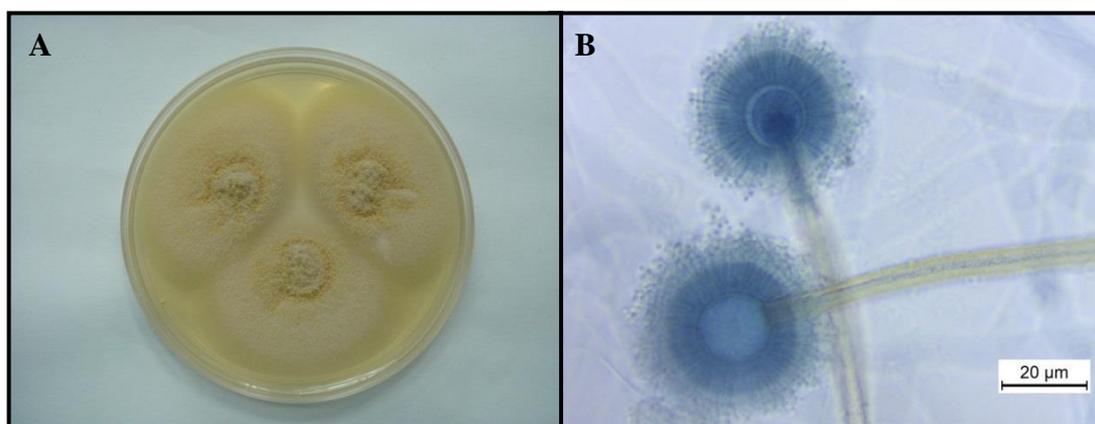
**Tabela 1** - Viabilidade e autenticação taxonômica de culturas de *Aspergillus* preservadas sob óleo mineral isoladas de torta de mamona a partir de 2007 na Coleção de Culturas - Micoteca URM.

URM*	ESPÉCIE	VIABILIDADE	AUT. TAXON.
5938	<i>Aspergillus caespitosus</i> Raper & Thom	+	Confirmada
5910	<i>Aspergillus awamori</i> Nakas	+	Confirmada
5870	<i>Aspergillus niveus</i> Blochwitz	+	Confirmada
5838	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh	+	Confirmada
5829	<i>Aspergillus varicolor</i> Thom & Raper	+	Confirmada
5827	<i>Aspergillus melleus</i> Yukawa	+	Confirmada
5794	<i>Aspergillus flavus</i> Link	+	Confirmada
5792	<i>Aspergillus sclerotiorum</i> G.A. Huber	+	Confirmada
5787	<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	+	Confirmada

Cont...

URM*	ESPÉCIE	VIABILIDADE	AUT. TAXON.
5774	<i>Aspergillus sydowii</i> Thom & Church	+	Confirmada
5701	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab	+	Confirmada
5698	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen	+	Confirmada
5620	<i>Aspergillus japonicus</i> Saito	+	Confirmada
5615	<i>Aspergillus stromatoides</i> Raper & Fennell	+	Confirmada
5611	<i>Aspergillus candidus</i> Link	+	Confirmada
5609	<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh	+	Confirmada
5608	<i>Aspergillus duricaulis</i> Raper & Fennell	+	Confirmada
5606	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	+	Confirmada

\* Número de acesso na Micoteca URM (Recife, Pernambuco, Brasil); + (viável); AUT= Autenticação.



**Figura 1.** *Aspergillus ochraceus* URM 5609; **A)** Colônia em agar extrato de levedura czapeck (CYA) com quatro dias de crescimento a 25°C; **B)** Conidióforos hialinos bisseriados e vesícula globosa (aumento de 40x).

Uma ampla variedade de fungos sobrevive nesse método, mantendo uma viabilidade entre 6, 7 e até mesmo 20 anos (Figueiredo, 2001). Espécies de *Cladosporium* e *Trichosporon* preservadas por este método e mantidas na Micoteca URM permanecem viáveis por até 40 anos (Silva, 2009).

Bezerra et al. (2006) obtiveram 20 culturas de *Coccidioides immitis* preservadas sob óleo mineral na Coleção de Culturas do Instituto Oswaldo Cruz e apenas cinco foram viáveis, mostrando que este método de preservação não foi adequado para esta espécie.

Figueiredo (2001) e Nakasone et al. (2004) afirmam que culturas de fungos podem ser preservadas sob óleo mineral por 20 a 32 anos respectivamente, o que evidencia as vantagens deste método pela viabilidade de algumas espécies após um período prolongado de preservação, além da redução da contaminação por ácaros, processo simples e econômico não necessitando de equipamentos onerosos podendo ser utilizado por coleções de pequeno e grande porte.

### **Seleção de culturas de *Aspergillus* produtoras de lipases**

Das 18 espécies testadas em meio sólido para detecção da capacidade lipásica, em nenhuma cultura foi observado um halo opaco ao redor da colônia, tanto a 28° quanto a 37°C. Porém, apesar da ausência de degradação em meio sólido, todos os isolados foram submetidos à fermentação em estado sólido (FES).

### **Seleção por FES**

A atividade lipolítica (AL) total, tendo como substrato o farelo de licuri como substrato, variou de 74,33 a 197,44 U/gss, sendo *A. candidus* URM 5611 o maior produtor, seguido de *A. flavus* URM 5794 e *A. sclerotiorum* URM 5792 com produção de 163,25 U/gss e 154,21 U/gss, respectivamente (Tabela 2).

Palma et al. (2000) obtiveram atividade lipolítica máxima por *Penicillium restrictum* de 27,8 U/gss com babaçu suplementado com peptona e Cordova et al. (2006) obtiveram com cultura de *Rhizopus rhizopodiformis* uma atividade total de 43,04 U/gss utilizando bagaço de cana com torta de oliva. Estes valores são inferiores aos obtidos neste trabalho, cerca de quatro vezes menor, com relação a todas as culturas para atividade lipolítica total.

Castiglioni et al. (2009) testou a produção de lipases por *A. fumigatus* em FES utilizando casca e farelo de arroz adicionado de óleo de oliva fonte de carbono. O valor obtido da atividade total de 117,02 U/gss foi semelhante ao obtido no presente estudo por *A. caespitosus* URM 5938, tendo como fonte de carbono o farelo de licuri e óleo de oliva, com atividade total de 117,33 U/gss. Porém, ainda foi inferior ao valor máximo obtido com *A. candidus* URM 5611 com atividade total de 197,44 U/gss.

Os fungos do gênero *Aspergillus* são muito utilizados na produção de enzimas. A produção de lipases por espécies de *Aspergillus* tem sido amplamente relatada, principalmente pelo fato dessa enzima ser normalmente extracelular. O triacilglicerol hidrolase, comumente conhecida como lipase é uma enzima catalítica com função de hidrolisar ésteres em triglicerídeos para produzir diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol (Sharma, et al., 2008). Essas reações apresentam vantagens dando as enzimas potenciais biotecnológicos, como estabilidade em solventes orgânicos, não requerimento de cofatores e ampla especificidade (Azeredo et al., 2007).

*Aspergillus candidus* URM 5611 mostrou-se um grande produtor de lipases, sendo selecionado para caracterização enzimática, mostrando-se uma nova espécie dentro do gênero, como promissora para ser utilizada em processos biotecnológicos, pois não há relatos na literatura da utilização dessa espécie para produção de lipases com aplicabilidade industrial. O tempo e o método de preservação não interferiram na produção lipolítica, pois cultura com até cinco anos *A. candidus* URM 5611 apresentou melhor atividade lipolítica total (U/gss).

Os resultados obtidos na seleção em meio sólido demonstram que este método não é um teste indicado para seleção de culturas de *Aspergillus* produtoras ou não de lipases, tendo em vista que todas as culturas são produtoras de lipases confirmadas na seleção em FES. Contudo, alguns autores demonstram a eficácia dessa metodologia como critério de seleção para outras enzimas, como por exemplo proteases e outros gêneros (Colen et al., 2005; Azeredo et al., 2007).

**Tabela 2.** Atividade lipolítica total (U/gss) produzidas por culturas de *Aspergillus*, utilizando como substratos farelo de licuri incubadas por 96 h.

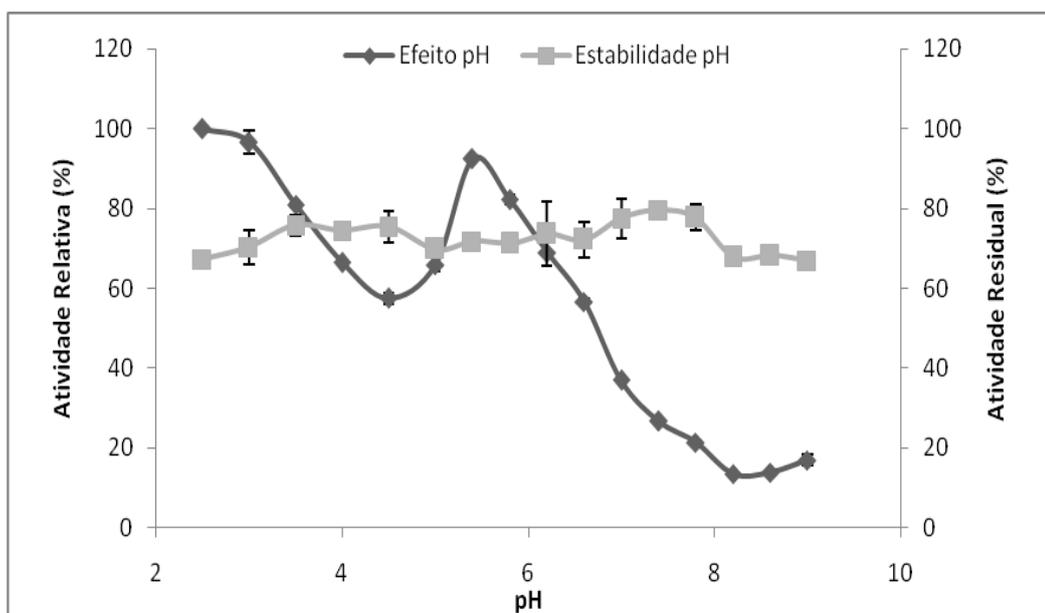
URM	Isolados	pH Final	SS (g)	SFS (g)	Umidade Final	Ativ.Total (U/gss)
5938	<i>Aspergillus caespitosus</i>	7,18	1,14	3,10	0,430	117,37
5910	<i>A.awamori</i>	7,42	1,30	3,18	0,350	99,08
5870	<i>A.niveus</i>	7,02	1,22	2,66	0,390	115,57
5838	<i>A.niger</i>	5,98	1,19	2,90	0,405	84,71
5829	<i>A.varicolor</i>	6,66	1,37	3,18	0,315	95,47
5827	<i>A.melleus</i>	6,43	1,18	2,56	0,410	112,88
5794	<i>A.flavus</i>	6,53	1,17	3,35	0,415	163,25

Cont...						
URM	Isolados	pH Final	SS (g)	SFS (g)	Umidade Final	Ativ.Total (U/gss)
5792	<i>A.sclerotiorum</i>	7,16	1,21	3,01	0,395	154,21
5787	<i>A.parasiticus</i>	6,38	0,92	2,98	0,540	110,00
5774	<i>A.sydowii</i>	6,98	1,02	2,92	0,490	94,90
5701	<i>A.versicolor</i>	6,82	1,14	3,07	0,430	143,33
5698	<i>A.fumigatus</i>	6,86	1,21	3,25	0,395	90,91
5620	<i>A.japonicus</i>	5,70	1,18	3,16	0,410	106,27
5615	<i>A.stromatoides</i>	6,32	0,99	3,50	0,505	128,28
5611	<i>A.candidus</i>	7,82	1,17	2,96	0,415	197,44
5609	<i>A.ochraceus</i>	6,69	1,10	2,43	0,450	128,73
5608	<i>A.duricaulis</i>	7,73	1,27	2,87	0,365	74,33
5606	<i>A.terreus</i>	6,79	1,27	3,07	0,365	81,89

SS = Substrato Seco após 18h a 80°C; SFS= Substrato Filtrado Seco após 18h a 80°C; Ativ.= Atividade; U/gsu = Unidade por grama em substrato úmido/ U/gss = Unidade por grama em substrato seco.

### Efeito e estabilidade ao pH

A maior atividade lipásica foi obtida em pH 2,5 (100%). A lipase de *Aspergillus candidus* URM 5611 foi estável na faixa de pH 2,5-9,0 com valores de atividade acima de 65%, a estabilidade máxima foi detectada em pH 7,4 com 79% de atividade residual. Estes resultados mostram que a lipase é estável em uma ampla faixa de pH (Figura 2).



**Figura 2** – Efeito (—◆—) e estabilidade (—■—) ao pH na atividade lipolítica em Fermentação em Estado Sólido (FES) produzida por *Aspergillus candidus* URM 5611 após 180 minutos de incubação com pH inicial variando de 2,5 a 9,0.

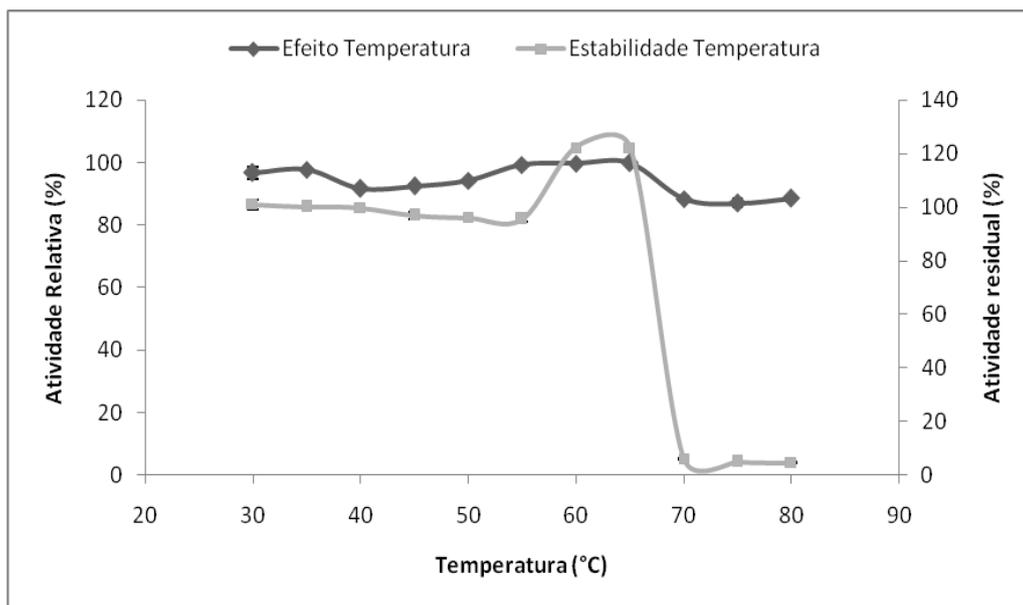
Mahadik et al. (2002), observaram que lipases produzidas por *Aspergillus niger* NCIM 1207 teve sua atividade máxima no pH 2,5, e Falony et al. (2006) mostraram a estabilidade das lipases numa faixa de pH 2,0-10,0 por *A. niger*, corroborando com os resultados nesse estudo.

Estudos de Pera et al. (2006), relatam que o pH ótimo de atividade de *Aspergillus niger* está em torno de 6,0. Cai et al. (2009) ao realizarem a purificação e caracterização parcial da lipase produzida por *Geotrichum* sp., observaram que a enzima foi estável entre pH 3,0-8,0. Lipases microbianas são mais estáveis na gama de pH de 2 a 10,5, como relatado por muitos dos investigadores acima citados. Resultados semelhantes foram relatados por outros lipases fúngicas (Phillips, 1991; Salleh et al., 1996).

Sabe-se que fatores como a origem e um mesmo organismo pode apresentar isoformas, além das condições do ensaio, tempo de incubação, pH, temperatura, metodologia e o substrato utilizado, podem interferir diretamente nas propriedades cinéticas e de estabilidade das enzimas (Carvalho et al., 2005).

### **Efeito e estabilidade a temperatura**

O efeito da temperatura sobre a atividade da lipase demonstrou que a atividade relativa máxima foi obtida a 65 °C (100%) (Figura 4). A enzima mostrou-se estável em temperaturas de 30°C a 65 °C, com valores de atividade acima de 95%, a enzima foi mais estável a 60 e 65°C com 120% de atividade residual. Estes resultados mostram que a lipase é estável em uma ampla faixa de temperatura (Figura 3).



**Figura 3** – Efeito (—◆—) e estabilidade (—■—) da temperatura na atividade lipolítica em FES por *Aspergillus candidus* URM 5611 após 180 minutos de incubação com temperatura inicial variando de 30 a 80°C em intervalos de 5°C.

Pastore et al. (2003) verificaram uma atividade ótima da lipase de *Rhizopus* próxima de 40°C. Em estudos realizados com *Yarrowia lipolytica* por Gonçalves (2007) foi verificado que as lipases produzidas apresentaram atividade ótima em temperatura de 30°C. Saxena et al. (2003) relatam que a temperatura ótima da lipase de *Aspergillus carneus* foi 37°C, diferindo dos resultados obtidos nesse estudo, uma vez que a temperatura ótima para a atividade de lipases produzidas por *Aspergillus candidus* foi 65°C.

Macêdo et al. (1997) e Carvalho et al. (2005) avaliaram as propriedades cinéticas da lipases de *G. candidum* em extrato bruto, onde as enzimas apresentaram estabilidade a 50°C. Maia et al. (2001) obtiveram uma temperatura de 35°C como a de maior estabilidade para a lipase produzida por *Fusarium solani* em meio basal com sais minerais, 0,5% de óleos vegetais e 0,5% de trioleína como fonte de carbono em 120h a 28°C.

Em vista dos resultados obtidos para a estabilidade sob diferentes temperaturas (Figura 5) para as lipases produzidas por fermentação em estado sólido de *Aspergillus candidus* URM5611, observa-se uma termoestabilidade para as lipases incubadas por

180 min em temperaturas entre 30° a 80° C em pH constante de 2,5 (tampão citrato fosfato 0,5 M), mantendo sua atividade residual acima de 100%. Esta termoestabilidade é importante para a aplicação de lipases na indústria de detergentes. Lipases termoestáveis tem sido isoladas de muitas fontes, incluindo *Mucor pusillus*, *Rhizopus homothallicus* e *Aspergillus terreus* (Singh; Mukhopadhyay, 2012). Uma das lipases mais estáveis isolada tem um máximo de atividade a 60°C e matem pelo menos 90% da atividade após 15 minutos a 60°C (Said; Pietro, 2004).

## **Conclusões**

Espécies de *Aspergillus* preservadas sob óleo mineral mantêm a viabilidade, características morfofisiológicas após longos períodos de estocagem. A seleção de cultura de *Aspergillus* em meio sólido para detecção de lipases, utilizado Tween 20 como substrato, não é adequada para as espécies desse gênero. Em fermentação em estado sólido todas as culturas apresentam atividade lipolítica utilizando resíduo de licuri como substrato de baixo custo. A atividade total das lipases produzidas variam de 74,33 a 197,44 U/gss. *Aspergillus candidus* URM 5611 apresenta maior atividade lipolítica, tendo uma atividade ótima em pH 2,5 a 65°C e a enzima é estável a uma faixa de pH 2,5 a 8,8 e 30 a 65°C, sendo uma espécie promissora para trabalhos posteriores.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq pela bolsa de mestrado de Cyndy Mary de Mello Farias, a Pós-Graduação em Biologia de Fungos (PGBF), a Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco.

## CAPÍTULO 2

# **PRODUÇÃO DE LIPASES POR *ASPERGILLUS CANDIDUS* URM 5611 UTILIZANDO RESÍDUO DE BAIXO VALOR COMERCIAL**

---

Trabalho submetido como Farias, C.M.M., Sousa, M. A., Souza, O. C., Magalhães, O. M. C., Medeiros, E. V., Moreira, K.A., Souza-Motta, C. M.. Produção de lipases por *Aspergillus candidus* URM 5611 utilizando resíduo de baixo valor comercial. *Word Jornal Microbiology and Biotechnology*.

## Resumo

*As lipases vêm conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais, pois o desenvolvimento de pesquisas com o uso de substratos de baixo custo para obtenção de enzimas tem sido uma alternativa para reduzir os custos de produção, assim este trabalho objetivou verificar as melhores condições de produção de lipases em relação à temperatura, pH, concentração de indutor e umidade durante 96 horas de produção das lipases por *Aspergillus candidus* URM 5611 em resíduo agroindustrial como substrato. Para determinação das melhores condições de produção foi realizado planejamento fatorial completo (2<sup>4</sup>) para avaliar os parâmetros temperatura, pH, concentração do indutor e umidade. Com estes resultados, conclui-se que o modelo quadrático proposto foi satisfatório para explicar os efeitos alcançados com as combinações das variáveis: temperatura, umidade indutor e pH.*

**Palavras-chave:** *Aspergillus*, processo fermentativo, resíduo agroindustrial, caracterização lipolítica.

## Introdução

As enzimas de fontes microbianas recebem uma particular atenção no mercado mundial de bioprodutos devido a sua atual e potencial aplicação na indústria, principalmente na de detergentes, óleos e gorduras, fabrica de laticínios e nas indústrias farmacêuticas. As principais utilizações das lipases industriais são em aditivos para lavagem, detergentes, industrias alimentícias (preparação de substitutos do chocolate amargo e produção de sabores especiais). Além disso, tem sido bastante utilizada na fabricação de cosméticos (bronzamento), em tratamentos de esgotos, e em diversas reações de transesterificação de triglicérides (Castro et al., 2004; Hasan et al., 2006; Treichel et al., 2010).

As lipases (E.C.3.1.1.3, triacilglicerol acilhidrolases) são enzimas que ocupam um lugar de destaque entre os biocatalisadores, e tem muitas aplicações, motivo esse que faz crescer significativamente sua participação no mercado mundial de enzimas industriais. Futuramente, essa classe enzimática terá importância industrial e comercial comparável as das peptidases, cuja venda entre as enzimas industriais, alcança de 25%

a 40% (Saxena et al., 2003; Hasan et al., 2006; Freire; Castilho, 2008; Cai et al., 2009; Barros, Fleuri, Macedo, 2010; Ghasemi et al., 2011).

O potencial biotecnológico das lipases está relacionado ao fato de que essas enzimas catalisam não apenas as reações de hidrólise, mas também as reações de esterificação e transesterificação, e mantem sua estrutura química e atividade em diferentes solventes orgânicos, e, muitas vezes, não requerem a presença de cofatores, catalisam diversas reações em baixa temperatura e pressão, possuem uma larga especificidade pelo substrato e exibem alta enantioselectividade (Tan et al., 2004; Reis et al., 2009; Acikel, et al., 2010; Contesini et al., 2010). Podem ser comumente encontradas na natureza e são obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microorganismos. Numerosas espécies de fungos filamentosos são produtoras dessas enzimas (Colen, 2006; Hasan et al., 2006; Vargas et al., 2008; Acikel et al., 2010; Contesini et al., 2010).

O gênero *Aspergillus* é atualmente considerado como um dos maiores produtores de substâncias biotecnológicas, com diversas espécies encontradas na natureza (Liu et al., 2006). Existem cerca de 837 (Hawksworth, 2011) espécies de *Aspergillus*, comumente isolados do solo e de plantas em decomposição. Estes fungos produzem um grande número de enzimas extracelulares, muitas das quais são aplicadas em vários ramos industriais (Guimarães et al., 2007).

A fermentação em estado sólido (FES) tem se tornado um grande atrativo para produção dessa enzima, como de outros produtos de alto valor agregado, devido à utilização de resíduos agroindustriais, bem como à maior produtividade volumétrica obtida (Mitchell, Berovic e Krieger, 2002; Ramachandran et al., 2007). Apesar das vantagens inerentes a FES, essa tecnologia é ainda pouco utilizada para produção de lipases em grande escala. Tal fato deve-se à carência de estudos sistemáticos em escala de bancada, como, por exemplo, a definição de microrganismos produtores, de substratos adequados e das condições de cultura (Hölker; Lenz, 2005).

Neste estudo, objetivou-se verificar a produção de lipase por *Aspergillus candidus* URM 5611 por fermentação em estado sólido utilizando resíduo de baixo custo.

## Metodologia

### Micro-organismo

O micro-organismo usado foi *Aspergillus candidus* URM 5611, isolado de torta de mamona, preservado sob óleo mineral (Sherf, 1943) desde 2007 na Coleção de Culturas - Micoteca URM do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

### Planejamento experimental para produção de lipases

Os parâmetros estudados foram: temperatura, umidade, indutor e pH, utilizando um planejamento fatorial completo ( $2^4$ ) (Tabela 1). Foram realizados dezesseis ensaios para o estudo da produção de lipases e 4 pontos centrais, os quais possibilitam a análise do erro experimental. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *Statistica 8* (Statsoft inc, 2008).

**Tabela 1** - Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo ( $2^4$ ) para a produção de lipases por *Aspergillus candidus* URM 5611.

Variáveis	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Temperatura (°C)	25	32,5	40
Umidade	45	60	75
Indutor (mL)	0	1,5	3,0
pH	5.5	6.5	7.5

### Fermentação em estado sólido (FES) para produção de lipase

O experimento foi realizado em duplicata utilizando frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL, com 10 g de farelo de licuri, óleo de oliva como indutor, umidade e pH ajustados de acordo com o planejamento. Foram esterilizados a 120°C durante 15 minutos em autoclave, resfriados e inoculados com 1 mL da suspensão de esporos na concentração  $5 \times 10^8$  esporos mL<sup>-1</sup> e incubados 30°C em estufa BOD (TECNAL) por 48, 72 e 96 horas (Sabu et al., 2005).

Para obtenção do extrato bruto, em 48, 72 e 96h, foram retirados três frascos para extração e dosagem da atividade enzimática. Em cada frasco foram adicionados 50 mL de água destilada esterilizada com 0,01% de Tween 80 e mantidos em agitador rotativo (Shaker) (TECNAL) a 150 rpm durante 10 minutos. O substrato fermentado foi submetido à filtração seriada usando gaze estéril e papel de filtro (CELAB 22,15 micra) com o auxílio de uma bomba a vácuo. Os filtrados foram distribuídos em tubos Falcon de 50 mL e preservados em 4°C (Sabu et al., 2005).

### **Atividade enzimática**

A atividade enzimática foi realizada pelo método titulométrico, utilizando óleo de oliva (10% m/v) como substrato para dosagem da enzima, o qual foi emulsionado com goma arábica (5% p/v) em água destilada. A 5 mL desta emulsão foi adicionado a 1 mL do extrato enzimático bruto, incubados por 1 hora a 37°C, posteriormente titulados com uma solução de NaOH (0,05 M) segundo Watanabe et al. (1977). A dosagem da atividade foi realizada utilizando fenolfitaleína como indicador e a média aritmética dos valores foi utilizada para determinação do cálculo da atividade enzimática. Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µ mol de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima que pode ser determinada através da equação segundo Leal (2002).

### **Resultados e discussão**

#### **Efeito das variáveis sobre a produção de lipase**

*Aspergillus candidus* URM 5611 utilizando óleo de oliva como fonte de carbono para produção lipolítica obteve uma eficiente atividade lipolítica (AL), porém na ausência desse óleo como indutor, houve aumento nesta produção teve atividade superior, sendo este selecionado para o estudo do efeito das variáveis independentes temperatura, pH, umidade, indutor e produção de lípases em fermentação em estado sólido a 48 h (Tabela 2).

A atividade máxima de lipases produzida por *A. candidus* URM 5611 foi 122,692 U/gss no ensaio 12 e ocorreu nas seguintes condições: 48 h de fermentação, sem a adição de óleo de oliva, em pH 7,5, 75% de umidade a 40°C. Porém, no ensaio

3, foi obtida uma atividade de 121,856 U/gss nas seguintes condições: 48 h de fermentação utilizando 0% de óleo de oliva, em pH 5,5, 75% de umidade a 25% (Tabela 2). Esta última condição foi a mais adequada por apresentar maior produção de lipases nos parâmetros analisados e em temperatura ambiente (25°C), portanto a análise estatística dos dados nesta temperatura foi selecionada para apresentação e discussão dos resultados.

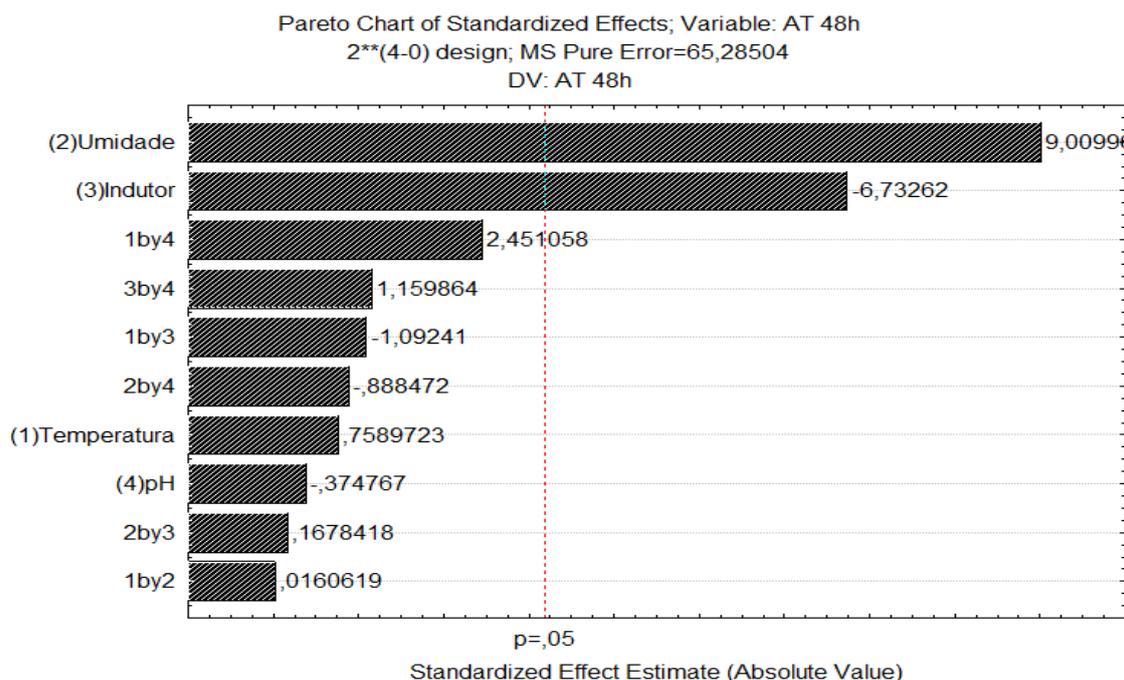
Este valor (121,856 U/gss) foi maior que o relatado por Kempka et al. (2008), os quais testaram um isolado de *Penicillium verrucosum* utilizando farelo de soja como substrato a 27,5°C, com umidade de 55%, e uma atividade de 40 U/gss em 48 horas de fermentação. Ul-Haq, Idress e Rajoka (2002), obtiveram 48 U/gss de atividade utilizando torta de amêndoa como substrato, a 30°C durante 72 horas pelo fungo *Rhizopus oligosporus*. No entanto, é menor que a atividade lipásica obtida por Mala et al. (2007) que avaliaram a produção de lipases por *Aspergillus niger* a 30°C, 62% de umidade utilizando farelo de trigo e torta de gergelim como substratos, obtendo 384 U/gss em 72 horas de fermentação. Segundo Santos et al. (2012), máxima atividade hidrolítica (71,88 U/gss) foi obtida pelo fungo *A. niger* quando utilizado farinha de semente de abóbora contendo 30% de umidade e temperatura de 30°C em 120h de fermentação. A interação entre a temperatura de fermentação e a umidade inicial do resíduo foi o parâmetro que mais influenciou o processo. A análise de superfície de resposta demonstrou que a produção máxima de lipase pode ser obtida em condições de temperatura e umidade da farinha entre 28 e 34,5°C e 25 e 32,5% ou entre 32 e 40°C e 58 e 65%, respectivamente, demonstrando o potencial da farinha de semente de abóbora para obtenção de lipase microbiana. Portanto, esses resultados mostram que as características físicas e químicas do substrato determinam a potencialidade na produção do composto de interesse e a associação de diferentes fontes de substratos pode contribuir para a eficiência e viabilidade econômica do processo.

**Tabela 2.** Resultados do planejamento experimental para a produção lipolítica por fermentação em estado sólido de *Aspergillus candidus* URM 5611.

Ensaio	Variáveis Experimentais				Atividade Total (U/gss)		
	Temperatura (%)	Umidade (%)	Indutor (%)	pH	48h	72h	96h
1	25	45	0	5,5	77,667	39,554	25,553
2	40	45	0	5,5	73,906	35,443	31,839
3	25	75	0	5,5	121,856	57,139	43,842
4	40	75	0	5,5	112,710	38,046	43,208
5	25	45	3	5,5	45,786	20,534	20,463
6	40	45	3	5,5	45,031	21,568	18,945
7	25	75	3	5,5	90,732	34,335	34,614
8	40	75	3	5,5	77,049	32,169	27,155
9	25	45	0	7,5	71,333	26,639	24,325
10	40	45	0	7,5	79,389	27,617	26,932
11	25	75	0	7,5	87,925	51,149	46,527
12	40	75	0	7,5	122,692	60,343	69,183
13	25	45	3	7,5	45,752	21,173	19,591
14	40	45	3	7,5	54,217	20,035	23,139
15	25	75	3	7,5	85,366	39,143	30,788
16	40	75	3	7,5	85,950	35,082	31,694
17	32,5	60	1,5	6,5	67,176	38,758	37,102
18	32,5	60	1,5	6,5	74,923	34,995	33,532
19	32,5	60	1,5	6,5	76,615	46,856	43,685
20	32,5	60	1,5	6,5	86,818	42,674	43,311

O gráfico de Pareto apresenta os efeitos estimados das variáveis (efeito principal ou de primeira ordem) e das interações entre as variáveis (efeito de segunda ordem) sobre as variáveis respostas (biomassa e atividade lipolítica), em ordem de magnitude. O comprimento das barras é proporcional ao efeito padronizado da variável. A linha vertical pode ser usada para julgar os efeitos estatisticamente significantes, pois as barras que se estendem através desta linha correspondem aos efeitos estatisticamente significantes com nível de confiança de 95% (Porto, 2008).

Foram demonstrados efeitos significativos nas variáveis estudadas, assim como as interações entre essas (Figura 1). Observou-se que, em 48 horas de fermentação a umidade apresentou efeito significativo positivo, enquanto o indutor apresentou efeito significativo negativo, que representa que os maiores níveis de umidade e menores níveis de indutor são melhores para a produção de lipases. As demais variáveis em estudo não foram significativas.



**Figura 1-** Gráfico de Pareto dos efeitos das interações quanto à resposta da atividade lipolítica com 48h de cultivo.

Geralmente os lipídios promovem um aumento da produção de lipases (Mahadik et al., 2002; Dominguez et al., 2003), entretanto, neste estudo a fonte lipídica acrescida parece ter exercido um efeito inibitório na produção da enzima. Uma situação semelhante foi observada por Vargas (2008) que avaliou a produção de lipases por *Penicillium simplicissimum* e verificou que a adição de diferentes óleo à torta de soja usada como substrato provocou uma diminuição da produção de lipases, dando indicativos de ocorrência de inibição por excesso de substrato.

Foi possível observar que os ensaios que tinham o indutor suplementando o substrato tiveram, de um modo geral, atividades inferiores aos obtidos sem o indutor. Isso demonstra que a fermentação utilizando apenas o farelo de licuri sem a adição do

óleo de oliva será o suficiente para ter uma boa produção de lipases por *A. candidus* URM 5611.

Segundo Mahanta et al. (2008) o teor de água é um fator bastante significativo nas propriedades físicas do substrato. Elevado teor de água causa a diminuição da porosidade do substrato, diminuindo assim a troca de gases. Por outro lado baixo teor de água pode acarretar na diminuição do crescimento microbiano e conseqüente menor produção de enzima.

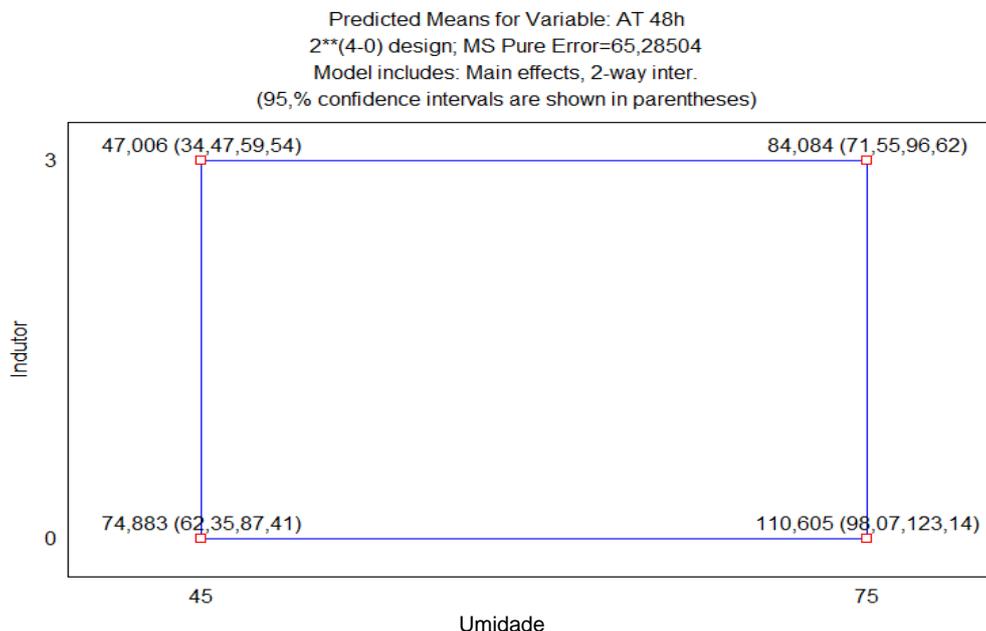
Inicialmente Dantas e Aquino (2010), avaliaram a influência do teor de água dos substratos, entre 35% e 65%, na produção de lipase através da FES. Onde verificou-se que houve maior produção de lipase quando empregado cascas de abacate (10 U/gss) e sementes de abóbora (24 U/gss) com teor de água de 35% e torta de babaçu (25 U/gss) e borra de café (13 U/gss) com teor de água de 45%. Quando utilizado torta de mamona como substrato obteve-se máxima atividade enzimática (19 U/gss) nos resíduos contendo teor de água de 35% e 45%.

Contudo, os valores máximos de atividade enzimática obtidos nesse estudo foram com 75% de umidade no farelo de licuri (121,856 U/gss e 122,692 U/gss), uma vez que sua influência foi significativa positivamente. Sendo assim, quanto maior a umidade no meio utilizando farelo de licuri para produção de lipases por *A. candidus* URM 5611 maior será a produção.

A umidade em níveis muito baixos prejudica o transporte de nutrientes e toxinas através da membrana e pode causar a perda das propriedades funcionais de enzimas da cadeia metabólica celular (Gervais e Molin, 2003).

Esta relação é compreendida melhor observando o gráfico quadrado (Figura 2). Nesse podemos verificar que os maiores valores de efeito encontram-se na sua base, ou seja, correspondem a umidade, mas este efeito é opostos em relação a concentrações de indutor.

As melhores condições de produção de enzimas com atividade lipolítica podem ser obtidas sem adição de indutor e uma maior umidade no meio de fermentação.



**Figura 2** – Gráfico quadrado das variáveis (indutor e umidade) tendo como variável resposta a atividade lipolítica.

Analisando os custos da fermentação, este resultado é muito interessante quando se projeta um processo em escala industrial, pois é mais vantajosa para a indústria a produção de enzimas lipolíticas utilizando substratos de baixo custo, por isso é interessante à condição na qual não se utiliza indutor, apresentando valores de atividade lipolítica superior aos ensaios que utilizava indutor (Tabela 2). Resultados semelhantes foram observados por Pinheiro (2006) o qual conclui que apesar do meio industrial apresentar uma menor produção em relação ao meio sintético, deve-se levar em consideração o baixo custo, mesmo que haja a necessidade de aumentar as concentrações dos substratos.

As melhores condições de produção de enzimas lipolíticas correspondem aos ensaios 3 (121,856 U/gss) e 12 (122,692 U/gss), os quais representam as condições opostas discutidas anteriormente, sendo a condição sem o extrato de levedura melhor para o uso industrial. Pode-se observar que ocorreu produção de lipases em todas as condições estudadas, o que demonstra o grande potencial do *A. candidus* URM 5611 para produção de lipases.

## **Conclusões**

Com base nos ensaios experimentais, as melhores condições de produção das lipases por *A. candidus* URM 5611 são 0% de indutor óleo de oliva, pH 5,5 ou 7,5, 75% de umidade a 25 ou 40°C, por 48 h de fermentação.

As variáveis umidade e indutor foram que mais afetam a produção de lipase por *A. candidus* URM 5611. Pode-se concluir que para se maximizar a produção de lipase por *A. candidus* URM 5611 utilizando farelo de licuri como substrato deve-se trabalhar com maior umidade sem a necessidade de indutor no meio.

Com estes resultados, conclui-se que o modelo quadrático proposto foi satisfatório para explicar os efeitos alcançados com as combinações das variáveis: temperatura, umidade, indutor e pH.

## **Agradecimentos**

Ao CNPq pela bolsa de mestrado de Cyndy Mary de Mello Farias, a Pós-Graduação em Biologia de Fungos (PGBF), a Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco.

## 5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

- Espécies de *Aspergillus* preservadas sob óleo mineral em coleções de culturas mostrou-se adequada por não afetar a viabilidade e as características morfológicas e fisiológicas das culturas após períodos de estocagem.
- A seleção de culturas de *Aspergillus* quanto à atividade lipolítica em meio sólido utilizando Tween 20 como substrato, não é eficiente para as espécies de *Aspergillus*.
- Em fermentação em estado sólido, espécies de *Aspergillus* apresentaram atividade lipolítica utilizando resíduo de licuri como substrato, sendo esse um substrato economicamente viável.
- *A. candidus* URM5611 e *A. sclerotiorum* URM5792 são indicados para determinação das melhores condições de produção de lipases utilizando farelo de licuri como substrato.
- *A. candidus* URM5611 apresenta a maior atividade lipolítica total de 197,44 U/gss, sendo selecionada para determinação de condições de produção e caracterização parcial da enzima.
- As melhores condições de produção das lipases por *A. candidus* URM5611 são 0% de indutor óleo de oliva, pH 5,5 ou 7,5, 75% de umidade a 25 ou 40°C, por 48 h de fermentação.
- As variáveis, concentração de indutor e teor de umidade mostraram efeito significativo sobre a produção de enzimas lipolíticas e o planejamento fatorial foi uma eficiente ferramenta para a determinação para as melhores condições de cultivo para a produção destas enzimas
- *Aspergillus candidus* apresenta maior atividade lipolítica de 197,44 U/gss, tendo uma atividade ótima em pH 2,5 a 65°C e a enzima foi estável em um faixa de pH 2,5 a 9,0 a 30 a 80°C sendo uma espécie promissora para trabalhos posteriores.
- O farelo de licuri apresenta grande potencial como substrato, possibilitando o bom desenvolvimento quanto à produção de lipases, uma vez que os resultados obtidos neste trabalho mostraram não haver necessidade de utilização de indutores, o que pode levar a uma considerável economia de matérias-primas no processo industrial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, M. M. V.; Tutunji, V. L. 2004. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. *Universitas Ciências da Saúde*, v. 2 (2): 236-251.
- Alim, M. A.; Lee, J. H.; Shin, J. A.; Lee, Y. J.; Choi, M. S.; Akoh, C. C.; Lee, K. T. 2008. Lipase catalyzed production of solid fat stock from fractionated rice bran oil, palm stearin, and conjugated linoleic acid by response surface methodology. *Food Chemistry*, London, v. 106: 712-719.
- AOAC Internation (2003). Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th edition. 2nd revision. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities.
- Aparecido, C. C.; Egydio, A. P. M.; Figueiredo, M. B. 2001. Avaliação de três métodos para preservação de fungos fitopatogênicos. *Summa-Phytopathologica*, v. 27 (4): 421-424.
- Açikel, U.; Er\_An, M.; Açikel, Y. S. 2010. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. *Food and Bioproducts Process*, v. 8: 31-39.
- Aikat, K.; Bhattacharyya, B.C. 2000. Protease extraction in solid state fermentation of wheat bran by a local strain of *Rhizopus orizae* and growth studies by the soft gel technique. *Process Biochemistry*, v.35: 907-914.
- Azeredo, L. A. I.; Gomes, P. M.; Sant'anna Jr, G. L.; Castilho, L. R.; Freire, D. M. G. 2007. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. *Current Microbiology*, v. 54 (5): 361-365.
- Baker, M.; Jeffries, P. 2006. Use of commercially available cryogenic vials for long-term preservation of dermatophytes fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44(2): 617-618.
- Barros, M.; Fleuri, L. F.; Macedo, G. A. 2010. Seed lipases: Sources, applications and properties – A review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 27 (1): 15-29.
- Beltrão, N. E. de M. Opções agrícolas brasileiras para produção de biodiesel. Disponível em: <[http://www.ahk.org.br/inwent/palestras/napoleao\\_beltrao.pdf](http://www.ahk.org.br/inwent/palestras/napoleao_beltrao.pdf)> Acesso em: set. 2012.
- Bezerra, C. C. F.; Lima, R. F.; Lazera, M. S.; Wanker, B.; Borba, C. M. 2006. Viability and molecular authentication of *Coccidioides immitis* strains from Culture Collection of the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39: 241-244.

- Björkling, F.; Godtfedsen, S.E.; Kirk, O. 1991. The future impact of industrial lipases. *TIBTECH*, v. 9: 360-363.
- Botella, C.; Diaz, A.; Ory, I.; Webb, C; Balandino, A. 2007. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid fermentation. *Process Biochemistry*, v. 42: 98-101.
- Braz, S. C. M.; Souza-Motta, C. M.; Massa, D. M. L.; Neves, R. P.; Magalhães, O. M. C. 2009. Viabilidade, confirmação taxonômica e caracterização enzimática de espécies de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral na Micoteca URM. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42 (1): 63-66.
- Brasil, Ministério do Meio Ambiente. 2008. Manejo sustentável dos recursos florestais da Caatinga. Natal: MMA, 28p.
- Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A. 2008. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado*, Rio de Janeiro.
- Burkert, J. F. M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M. I. 2004. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *BioresourTechnology*, v. 91: 77-84.
- Cai, Y.; Wangb, L.; Liao, X.; Ding, Y.; SUN, J. 2009. Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBC WU-3. *Process Biochemistry*, v. 44: 786-790.
- Cammarota, M. C.; Freire, D. M. G. 2006. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource Technology*, v. 97: 2195-2210.
- Carvalho, P. O.; Campos, P. R. B.; Noffs, M. D.; Oliveira, J. G.; Shimizu, M. T.; Silva, D. M. 2003. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, v. 26: 75-80.
- Carvalho, P. O.; Calafatti, S. A.; Marassi, M.; Silva, D. M.; Contesini, F. J.; Bizaco, R. 2005. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Química Nova*, v. 28 (4): 614-621.
- Carvalho, N. O. S.; Pelacani, C. R.; Rodrigues, M. O. de. S.; Crepaldi, I. C. 2005. Uso de substâncias reguladoras e não-específicas na germinação de sementes de licuri (*Syagrus coronata* (MART.) BECC). *Sitientibus Serie Ciências Biológicas*, v. 5 (1): 28-32.
- Castiglioni, G. L.; Bertolin, T. E.; Costa, J. A. V. 2009. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. *Química Nova*, v. 32 (2): 292-295.
- Castilho; Polato, C. M. S.; Baruque, E. A.; Sant'Anna, Jr., G. L.; Freire, D. M. G. 2000. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-

- satate and submerged fermentations. *Biochemistry Engineering Journal*, v. 4: 239-247.
- Castro, H. F. et al. 2004. Modificacao de oleos e gorduras por biotransformacao. *Química Nova*, v. 27 (1): 146-156.
- Castro-Ochoa, L. D.; Rodriguez-Gómez, C.; Valerio-Alfaro, G.; Ros, R. O. 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme Microbial Technology*, v. 37: 648-654.
- CEMAVE. Projetos de conservação de campo / Arara-azul-de-Lear. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/cemave/>. Acesso em 05/02/ 2012
- Cihangir, N.; Sarikaya, E. 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, v. 20: 193–197.
- Colla, L.M.; Rizzardi, J.; Pinto, M. H.; Reinehr, C.O.; Bertolin, T.E.; Vieira Costa, J.A. 2010. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresource Technology*, v.101: 8308 -14.
- Colen, G; Juequeira, R. G.; Moraes-Santos, T. 2005. Isolation and screening of alkaline lipase-production fungi from Brazil savana soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 22: 881-885.
- Colen, G. 2006. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. p, 206.
- Contesini, F. J.; Silva, V. C. F; Maciel, R. F.; Lima R. J.; Barros, F. F. C; Carvalho, P.O. 2009. Response surface analysis for the production of na enantioselective lipase from *Aspegillus niger* by solid-state fermentation. *The Journal of Microbiology*, v. 47: 563-571.
- Contesini, F. J.; Lopes, D. B.; Macedo, G. A.; Nascimento, M. G.; Carvalho, P. O. 2010. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67: 163–171.
- Cordova, J.; Nemmaoui, M.; Ismaili-Alaoui, M.; Morin, A.; Roussos, S.; Raimbault, M.; Benjilali, B. 2006. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 5 (1-4): 75-78.
- Costa, V. E. U.; Amorim, H. L. N. de. 1999. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. Porto Alegre, Brasil. *Química Nova*, v.22.
- Couto, S. R.; Sanromán, M. A. 2006. Application of solid stat fermentation to food industry – A review. *Journal of Food Engineering*.

- Crepaldi, I. C.; Almeida-Muradian, L. B. de.; Rios, M. D. G.; Penteado, M. de V. C.; Salatino, A. 2001. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) *Revista Brasileira Botânica*, São Paulo, v. 24 (2).
- Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M. da G.; Soldi, V. 2004. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v.27 (4): 623-630.
- Dantas, E. M; Aquino, L. C. L. 2010. Fermentação em Estado Sólido de diferentes resíduos para a obtenção de Lipase Microbiana. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.12 (1): 81-87.
- Di Luccio, M.; Capra, F.; Ribeiro, N. P. 2004. Effect of temperature, moisture, and carbono supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *Aplied Biochemistry Biotechnology*, v.113: 173-180.
- Diaz, J. C. M.; Rodríguez, S.; Roussos, J.; Cordova, A.; Abousalham.; Carrière, F.; Baratti, J. 2006. Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme Microbial Technology*, v. 39: 1042-1050.
- Dominguez, A.; Costas, M.; Longo, M. A.; Sanroman, A. 2003. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, v.25: 1225-9.
- Drumond, M. A. 2007. Licuri *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. Embrapa: Documentos 199. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 16p.
- Elibol, M; Ozer, D. 2000. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*, v.36: 329-52.
- Ellaiah, P.; Prabhakar, T.; Ramakrishna, B.; Taleb, A.T.; Adinarayana, K. 2004. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, v. 39: 525-528.
- Falony, G.; Armas, J. C.; Mendoza, J. C. D.; Hernández, J. L. M. 2006. Production of *A. niger* Lipase, *Food Technology and Biotechnology*, v. 44 (2): 235-240.
- Figueiredo, M. B. 2001. Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico*, v. 63: 73-82.
- Foresti, M. L.; Ferreira, M. L. 2006. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterification. *Enzyme and Microbial Technology*.
- Freire, D. M. G.; Castilho, L. R. 2000. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 81(1/2): 48-56.
- Freire, D. M. A; Castilho, L. R. 2008. Lipases em biocatálise. In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M. A.; Corvo, M. L. (Ed.) *Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, p. 506.

- Freitas, L.; Bueno, T.; Perez, V. H.; Santos, J. C.; Castro, H. F. 2007. Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, v. 23: 1725–1731.
- Gandra, K. M.; Bianchi, M. D.; Godoy, V. P.; Queiroz, F. P. C.; Steel, C. J. 2008. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*.
- Geiser, D. M.; Klich, M. A.; Frisvad, J. C.; Peterson, S. W.; Varga, J.; Samson, R. A. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, v. 59: 1–10.
- Geiser, D. M. 2009. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Medical Mycology*, v. 47: 21–26.
- Gervais, P.; Molin, P. 2003. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemistry Engineering Journal*, v. 13: 85-101.
- Ghasemi, Y. et al. 2011. Isolation and characterization of some moderately halophilic bacteria with lipase activity. *Microbiology*, v. 80 (4): 483-487.
- Guimarães, L. H. S. et al. 2007. Production and characterization of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*, v.42: 52-57.
- Godoy, M. G.; Gutarra, M. L. E.; Castro, A. M.; Machado, O. L. T.; Freire, D. M. G. 2011. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.38: 945–53.
- Gonçalves, F. A. G. 2007. *Produção de lipases extracelular por leveduras em cultivo submerso*. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Gotor, V. 2002. Lipases and (R)-oxynitrilases: useful tools in organic synthesis. *Journal Biotechnology*, v. 96 (1): 35-42.
- Gottschal, J. C.; Harder, W.; Prins, R. A. 2009. *Principle of Enrichment, isolation, cultivation an preservation of bacteria*. Disponível em: <<http://microimm.queensu.ca/micr433/enrichment%20.pdf>>. Acesso em: 15/08/2012.
- Gutierrez, R. M.; Favela-Torres, E.; Cordova-Lopes, J. Garciarivero, N M. 1998. Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v.33 (2): 103-103.

- Hamdy, H. S.; Abo-Tahon, M. A. 2012. Extracellular lipase of *Aspergillus terreus* var. *africanus*. *Annals of Microbiology*, v. 62: 1723–1736.
- Hankin, L.; Anagnostakis, S. L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, v. 67: 597-607.
- Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*.
- Hawksworth, D. L.; Crous, P. W.; Redhead, S. A.; Reynolds, D. R.; Samson, R. A.; Seifert, K. A.; Taylor, J. W.; Wingfield, M. J. 2011. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus*, v. 2 (105): 112.
- Hölker, U.; Höfer, M.; Lenz, J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* v. 64: 175-186.
- Hölker, U; Lenz, J. 2005. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, v. 8 (3): 301-306.
- Iwashita, K. 2002. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.94: 530-535.
- IBAMA – Brazilian Institute of Environment and Natural Renewable Resources. 2006. *Management plan for the Lear's Macaw (Anodorhynchus leari)*. Brasília: IBAMA/Fauna Species Protection Coordination, 80p.
- Jaeger, K. E.; Dijkstra, B.W.; Reetz, M. T. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu. R. Microbiol*, 315-351.
- Jaeger, K. E.; Eggert, T. 2002. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13: 390-397.
- Kamini e Puvanakrishnan, 1998. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry*, v. 33 (5): 505-511.
- Kamini, N. R; Fujii, T.; Kurosu, T, Iefuji, H. 2000. Production. Purification and characterization of an extracellular lipase from yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry*, v.36: 317–24.
- Kanwar, L.; Gogoi, B. K.; Goswami, P. 2002. Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. *Bioresource Technology*, v.84: 207–211.
- Kempka, A. P.; Lipke, N. L.; Pinheiro, T. L. F.; Menocin, S.; Treichel, H.; Freire, D. M. G.; Di Luccio, M.; Oliveira, D. 2008. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 31 (2): 119-125.

- Klich, M. A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. *Central bureau vöör Schimmelcultures*, p.116 .
- Knez, E. 2009. Enzymatic reactions in dense gases. [Review]. *Journal of Supercritical Fluids*, 47(3): 357-372.
- Krishna, S. H.; Karanth, N. G. 2001. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A Kinetic study. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 1547: 262-267.
- Kronbauer, E. A. W.; Peralta, R. M.; Osaku, C. A.; Kadowaki, M. K. 2007. Produção de xilanase por *Aspergillus casingii* com diferentes fontes de carbono. *B CEEPA*, v. 25 (2).
- Ko, W. H.; Wang, I. T.; Ann, P. J. 2005. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, v.37: 597–599.
- Leal, M. C. M. R.; Cammarota, M. C.; Freire, D. M. G.; Sant`anna Jr., G. L. 2002. Hydrolytic enzymes as coadjutants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 19: 175-180.
- Lima, D. M. M. 1991. Preservação de espécies de *Fusarium* som óleo mineral. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 2 (6): 853-855.
- Lima, R. F.; Borba, C. M. 2001. Viability, morphological, characteristics and dimorphic ability off ungi preservation by different method. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 18: 191-196.
- Lima, V. M. G.; Krieger, N.; Sarquis, M. I. M.; Mitchell, D. A.; Ramos, L. P.; Fontana, J. D. 2003. Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*, *Food Technol. Biotechnol.*, v. 41: 105-110.
- Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. 2007. *Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. 2. reimpr. São Paulo: E. Blücher, v. 3.
- Lin, S. F.; Chiou, C. M.; Tsai, Y. C. 1995. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Biotechnology Letters*, v. 30: 959-962.
- Liu, C. et al. 2006. Purification and characterization of soluble invertases from suspension-cultured bamboo (*Bambusa edulis*) cells. *Food Chemistry*, n.96: 621-631.
- Liu, Z.; Chi, Z.; Wang, L.; Li, J. 2008. *Biochemistry Engineering Journal*, v. 40: 445-451.
- Lorenzi, H. 2010. Flora brasileira Lorenzi: *Arecaceae* (palmeiras). 1 ed. São Paulo: Nova Odessa, 367p.

- Macêdo, G. A.; Park, Y. K.; Pastore, G. M. 1997. Partial purification and characterisation of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Revista de Microbiologia*, v. 28: 90-95.
- Mahadik, N. D.; Puntambekar, U. S.; Bastawde, K.B.; Khire, J. M.; Gokhale, D. V. 2002. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 38: 715–21.
- Mahanta, N.; Gupta, A.; Khare, S. K. 2008. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresource Technology*, v. 99: 1729–1735.
- Maia, M. M. D.; Heasley, A.; Camargo de Moraes, M. M.; Melo, E. H. M.; Moraes, Jr, M. A.; Ledingham, W. M.; Lima Filho, J. L. 2001. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource Technology*, v.76: 23-27.
- Mala, J. G. S.; Edwinoliver, N. G.; Kamini, N. R.; Puvanakrishnan, R. 2007. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. *The Journal of General and Applied Microbiology*, v. 53 (4): 247-253.
- Maróstica, J.; Pastore, G. M. 2005. Biotransformação de resíduos agroindustriais em compostos funcionais e de aroma. IN: *Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Recife, p.15.
- Matsuoka, H.; Miura, A.; Hori, K. 2009. Symbiotic effects of a lipase-secreting bacterium, *Burkholderia arboris* SL1B1, and a glycerol-assimilating yeast, *Candida cylindracea* SL1B2, on triacylglycerol degradation, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 107(4): 401-408.
- Mendes, A. A.; Castro, H. F.; Pereira, E. B.; Furigo Júnior, A. 2005. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Química Nova*, v.28 (2): 296-305.
- Messias, J. M.; Costa, B. Z.; Lima, V. M. G.; Giese, E. C.; Dekker, R. F. H.; Barbosa, A. M. 2011. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 32 (2): 213-234.
- Micoteca. Histórico. 2012.  
Disponível em: < <http://www.ufpe.br/micoteca/historico.html>>. Acesso em: 25/10/2012.
- Mitchell, D. A.; Berovic, M.; Krieger, N. 2002. Overview of Solid State Bioprocessing. *Biotechnology Annual Review*, v. 8: 183-225.
- Mitchell, D. A.; Berovic, M.; Nopharatana, M.; Krieger, N. The bioreactor Step of SSF. 2006.: A Complex Interaction of Phenomena. In: Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. Ed. Springer, *Heidelberg*, p.13-32.

- MMA – Ministério do Meio Ambiente. Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. 2003. Instrução Normativa do Ministério do Meio Ambiente nº03/2003. Diário Oficial da União, nº 101, Seção 1, p. 88-97 (28.05.2003).
- Murugan, s.; Arnold, D.; Pongiya, U. D.; Narayanan, P. M. 2011. Production of xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 using saw dust as substrate under solid state fermentation. *Enzyme Research*, London, v. 2011, p. 1-7.
- Nakasone, K. K.; Peterson, S.W.; Jong, S.C. 2004. *Maintenance and preservation of cultures*.
- Neufeld, P. N.; Sarquis, M. I. M. 2003. Preservação em laboratório de fungos filamentosos pelo método do óleo mineral. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 35(3): 147-150.
- Palma, M. B.; Pinto, A. L.; Gombert, A. K.; Seitz, K. H.; Kivatinitz, S. C.; Castilho, L. R.; Freire, D. M. G. 2000. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84-86: 1137-1145.
- Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C. R.; Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, v.77: 149-162.
- Pandey, A.; Soccol, C. R.; Mitchell, D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, v. 35: 1153-1169.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemistry Engineering Journal*, v.13: 81-4.
- Pastore, G. M.; Costa, V. S. R.; Koblitiz, M. G. B. 2003. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipases extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v. 23 (2): 135-140.
- Pera, L. M.; Romero, C. M.; Baigori, M. D.; Castro, G. R. 2006. Lipase extracts from *A. niger*, *Food Technology and Biotechnology*, v. 44 (2): 247–252.
- Phillips, A.; Pretorius, G. H. J. 1991. Purification and characterization of an extracellular lipase of *Galactomyces geotrichum*, *Biotechnology Letters*, v. 13: 833–838.
- Pinheiro, T. L. F. 2006. *Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando Penicillium verrucosum como microrganismo*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada.
- Pinto, G. A. S. 2005. *Fermentação em Estado Sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais*. Comunicado técnico. Embrapa. ISSN 1679-6535.

- Porto, T. S.; Medeiros e Silva, G. M.; Porto, C. S.; Cavalcanti, M. T. H.; Neto, B. B.; Lima-Filho, J. L.; Converti, A.; Porto, A. L. F.; Pessoa, Jr. A. 2008. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemistry Engineering Process*, v. 47: 716–721.
- Ramalho, C. I. 2008. Estrutura da vegetação e distribuição espacial do licuri (*Syagrus coronata* (Mart) Becc.) em dois municípios do centro norte da Bahia, Brasil. 131f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba.
- Raper, K. B.; Fennell, D. I. 1965. The genus *Aspergillus*. 1<sup>st</sup> ed. Baltimore: The Willians & Wilkins Company, p.686.
- Ramachandran, S.; Patel, A. K.; Nampoothiri, K. M.; Francis, F.; Nagy, V.; Szakacs, G.; Pandey, A. 2004. Coconut oil cake- a potencial raw material for the production of  $\alpha$ -amylase. *Bioresource Technology*, v. 93: 169-174.
- Ramachandran, S.; Singh, S. K.; Larroche, C.; Soccol, C. R.; Pandey, A. 2007. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. *Bioresource Technology*, v. 98 (10): 2000-2009.
- Reis, P.; Holmberg, K.; Watzke, H.; Leser, M. E.; Miller, R. 2009. Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, Amsterdam, v. 147–148: 237–250.
- Rigo, E.; Ninowa, J. I.; Di Luccio, M.; Oliveira, J. V.; Polloni, A.; Remonato, D. 2010. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *LWT- Food Science Technology*, v.43 (7): 1132–7.
- Rodrigues, E. G.; Lírio, V. S.; Lacaz, C. S. 1992. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico e água destilada. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, São Paulo, v. 34 (2): 159-165.
- Rodrigues, K. A. *Tratamento biológico de água residuária sintética de laticínios por decomposição fúngica*. Fortaleza, Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração em Saneamento Ambiental), Universidade Federal do Ceará. 1999.
- Romeiro, R. S. 2001. *Preservação de culturas de bactérias fitogênicas*. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Viçosa – MG, 9 p.
- Rosa, C. A. R., Campos, S. G., Baroni, F. A. 2002. Práticas de micologia veterinária. UFRRJ. Instituto de veterinária. Departamento de micologia e imonologia veterinária. *Micologia Veterinária*. Prática 8. Seropédia.
- Rosa, D. R.; Camarota, C. M.; Freire, D. M. G. 2006. Production and utilization of a new solid enzymatic preparation produced by *Penicillium restrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease, *Environmental Engineering Science*, v. 23(5): 814-23.

- Rocha, K. M. R. 2009. Biologia reprodutiva da palmeira licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.) (Arecaceae) na ecorregião do Raso da Catarina, Bahia. p. 82. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco.
- Roux Van der Merwe, M.P.; Badenhorst, J.; Britz, T.J. 2005. Fungal treatment of an Edible-oil-containing industrial effluent. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, v. 21 (6-7): 947-953.
- Rufino, M.U.L.; Costa, J.T.M.; Silva, V.A.; Andrade, L.H.C. 2008. Conhecimento e uso do ouricuri (*Syagrus coronata*) e do babaçu (*Orbignya phalerata*) em Buíque, PE, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, Porto Alegre, v. 4: 1141-1149.
- Sabu, A.; Kiran, G. S.; Pandey, A. 2005. Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620. *Food Technology and Biotechnology*, v. 43 (2): 133-138.
- Said, S.; Pietro, R. C. L. R. 2004. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 412.
- Salleh, A. B.; Razak, C. N. A.; Samad, M. Y.; Ampon, A. K.; Yunus, W. M. Z.; Basri, M. 1996. Partial purification and characterization of lipases from thermophilic *Rhizopus rhizopodiformis*, *S. Malaysiana*, v. 25: 131–141.
- Samson, R. A.; Noonim, P.; Meijer, M.; Houbraeken, J.; Frisvad, J. C.; Varga, J. 2007. Diagnostic tools to identify black aspergilla. *Studies in Mycology*, 59:129-145.
- Samson, R. A.; Varga, J. 2009. What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology*, v. 47: 13–20.
- Santos, H. M. V.; Santos, V. de J. 2002. *Estudo etnobotânico do licuri Syagrus coronata (Martius) Beccari em Senhor do Bonfim, Bahia*. Disponível em: <<http://projeticuri.ubbihp.com.br>> Acesso em: 17 set. 2012.
- Santos, D. T.; Sarrouh, B. F.; Santos, J. C.; Pérez, V. H.; Silva, S. S. 2006. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia. *Janus*. v. 3 (4): 164-183.
- Santos, R. C. A.; Araújo, K. B. A.; Soares, C. M. F.; Aquino, L. C. L. 2012. Evaluation of temperature and moisture response surface on the lipase from pumpkin seeds fermentation using *Aspergillus niger*. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 34 (3): 255-260.
- Saxena, R. K.; Ghosh, P. K.; Gupta, R.; Davidson, W. S.; Barodoo, S.; Gulati, R. 1999. Microbial lipase: potential biocatalyst for the future industry. *Currente Science*, v.77: 101–115.
- Saxena, R. K.; Davidson, W. S.; Sheoran, A.; Giri, B. 2003. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry*, v. 39: 239–247.

- Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. 2001. *Biotechnologia Industrial – vol.2*. São Paulo. Edgard Blücher LTDA,
- Shankar, S. K.; Mulimani, V. H. 2007.  $\alpha$ -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, v. 98: 958-961.
- Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19: 627-662.
- Sharma, Y. C.; Singh, B.; Upadhyay, S. N. 2008. Advancements in development and characterization of biodiesel. *A review. Fuel*, v. 87: 2355-2373.
- Sherf, A. F. 1943. A method for maintaining *Phytophthora septentrionalis* in culture for long periods without transfer. *Phytopathology*, v. 33: 330-332.
- Shin, J. A.; Akoh, C. C.; Lee, K. T. 2010. Enzymatic interesterification of anhydrous butterfat with flaxseed oil and palm stearin to produce low-trans spreadable fat. *Food Chemistry*, London, v. 120: 1-9.
- Singhania, R. R.; Soccol, C. R.; Pandey, A. 2008. Application of tropical agro-industrial residues as substrate for solid-state fermentation processes. In: Pandey A, Soccol RR, Larroche C, editors. *Current development in solid-state fermentation*, v. 4: 412-42.
- Singhania, R. R.; Patel, A. K.; Soccol, C. R.; Pandey, A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 44: 13-18.
- Sierra, G. A. A. 1957. Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonine van Leeuwenhoeck*, v. 28: 15-22.
- Silva, A. M. M.; Borba, C. M.; Oliveira, P. C. 1994. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil of long periods of time. *Mycoses*, v. 37: 165-169.
- Silva, P.; Mitidieri, S.; Schrank, A.; Vainstein, M. H. 2005. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, v. 40: 321- 326.
- Silva, V. J. S. 2009. *Deteção enzimática de culturas de Trichosporon mantidas na Micoteca URM*. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas, Bacharelado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Silva, M. F.; Freire, D. M. G.; De Castro, A. M.; Luccio, M. D.; Mazutti, M. A.; Oliveira, J. V. 2011. Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. *Bioprocess Biosystems Engineering*, v. 34 (2): 145-52.

- Singh, A. K.; Mukhopadhyay, M. 2012. Overview of fungal lipase: A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 166: 486–520.
- Slivinski, C. T. 2007. *Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de Aspergillus niger obtida por fermentação em estado sólido*. Ponta Grossa: Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 128p. Dissertação.
- Smith, D.; Onions, A. H. S. 1994. The preservation and maintenance of living fungi. *IMI Technical Handbooks*, 2 ed. Egham: CAB International, p. 122.
- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. S. 2003. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemistry Engineering Journal*, v. 13: 205-218.
- Souza, V. C.; Lorenzi, H. 2008. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias nativas e exóticas no Brasil, baseado no APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2.ed, 324p.
- Statsoft, inc. Statistica (data analysis software system), version 6. 2001. (Software estatístico).
- Tan, T.; Zhang, M.; Xu, J.; Zhang, J. 2004. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. *Proc. Biochem.*, v. 39: 1495-1502.
- Treichel, H. et al. 2010. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technology*, v. 3: 182-196.
- Uhl, N. W.; Dransfield, J.; Davis, J. I.; Luckov, M. A.; Hansen, K. S.; Doyle, J. J. 1995. Phylogenetic relationships among palms: cladistic analyses of morphological and chloroplast DNA restriction site variation. In: RUDALL, P. J.; CRIBB, D. F.; CUTLER, E.; HUMPHRIES, C. J. (Ed.). *Monocotyledons: systematics & evolution* Kew: Royal Botanic Gardens, p. 623-661.
- Ul-Haq, I.; Idress, S.; Rajoka, M. I. 2002. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 37: 637-641.
- Vargas, G. D. L. P. et al. 2008. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83: 47-54.
- Vieira, G. A. B.; Lemos, T. L. G.; Mattos, M. C.; Oliveira, M. C. F.; Melo, V. M. M.; Gonzalo, G.; Gotor-Fernandez, V.; Gotos, V. 2009. Chemoenzymatic synthesis of optically active Mugetanol isomers: use of lipases and oxidoreductases in fragrance chemistry, *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 20(2): 214-219.
- Villeneuve, P.; Muderhwa, J. M.; Graille, J.; Haas, M. J. 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, v. 9: 113–148.

Viniegra-González, G.; Favela-Torres, E.; Aguilar, C. N.; Rómerogomes, S.J.; Díaz-Godínez, G.; Augur, C. 2003. Advantages of fungal Enzyme production in solid state over liquid fermentation system. *Biochemical Engineering Journal*, v.13: 157-167.

Watanabe, N.; Ota, Y.; Minoda, Y.; Yamada, K. 1977. Isolation and identification of alkaline lipases producing microorganismos, cultural conditions and some properties. *Agricultural and Biological Chemistry.*, v. 41: 1353-1348.

Word Data Center for Microorganisms (WDCM). Home page of culture collection in the word.

Disponível em: <<http://wdsn.nig.ac.jp/hpcc.html>>. Acesso em: 09/08/2012

