



ISSN: 1984-3151

SELEÇÃO DE MEIOS DE PRODUÇÃO DE LIPASE POR AMOSTRAS DE *ASPERGILLUS* SP ISOLADAS DA CAATINGA DE PERNAMBUCO

SELECTION OF MEDIA OF PRODUCTION LIPASE SAMPLES BY *ASPERGILLUS* SP ISOLATED FROM CAATINGA IN PERNAMBUCO

Brindize Ferreira de Lima¹; Henrique Siqueira Amorim²; Aline Elesbão do Nascimento³; Galba Maria de Campos Takaki⁴; Carlos Alberto Alves da Silva⁵

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

Recebido em: 27/02/2014 - Aprovado em: 30/04/2014 - Disponibilizado em: 31/05/2014

*RESUMO: O setor de produção de enzimas microbianas tem crescido nas últimas décadas, motivado pela sua utilização nos diversos segmentos industriais. Por isso novas iniciativas em pesquisa resultam na produção de inovações dos processos e desempenho de produtos já existentes no mercado. Assim se observa que os fungos filamentosos compõem o grupo de microrganismos com maior número de espécies produtoras de compostos biotecnológicos, utilizados em diversos ramos industriais, e apresentam uma imensa variedade morfológica e um elevado potencial bioquímico e fisiológico. Nesse aspecto o gênero *Aspergillus* se destaca por apresentar uma grande capacidade na produção de bioprodutos de alto valor agregado, principalmente em enzimas microbianas. A seleção adequada dos nutrientes na elaboração dos meios de produção de lipase envolve uma série de estudos prévios para introdução de substratos que quimicamente sejam constituídos de ácidos graxos de cadeia longa e possam produzir a enzima em maiores quantidades. A Caatinga é uma região pouco explorada biotecnologicamente, possuindo uma imensa população microbiana, que apresenta um elevado potencial enzimático desconhecido. Foram realizados ensaios de seleção utilizando 6 meios de produção diferentes para produção de lipase, usando as amostras, denominadas SIS 10 e SIS 16, isoladas da Caatinga de Pernambuco. Os ensaios de produção ocorreram a 150 rpm, 28°C, durante 144 horas. Os resultados obtidos evidenciaram que*

o melhor meio testado foi o meio 4, com a amostra SIS 16, obtendo uma produção de 2,16 U/mg de lipase. O estudo da seleção de meios de produção de enzimas microbianas é um recurso necessário para obtenção de novos meios com elevado potencial de produção.

PALAVRAS-CHAVE: Seleção de meios. *Aspergillus*. Lipase fúngica.

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

KEYWORDS: Media selection. *Aspergillus*. Fungal lipase.

1 INTRODUÇÃO

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

As lipases (E.C.3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de gorduras e óleos, liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; COLLA; REINEHR; COSTA, 2012), possuindo a capacidade de catalisar reações de esterificação, transesterificação e interesterificação em solventes orgânicos (VILLENEUVE *et al.*, 2000;

CARVALHO; AIRES-BARROS; CABRAL, 2000; SATOH *et al.*, 2002; AKOH *et al.*, 2004; BASSEGODA; CESARINI; DIAZ, 2010; ANDUALEMA; GENESSESSE, 2012; STERGIOU *et al.*, 2013). Esta classe de enzimas é produzida por animais, vegetais e diversos gêneros de microrganismos (POKORNY; FRIEDRICH; CIMERMAN, 1994; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; ZHAO *et al.*, 2013), sendo definidas quimicamente como carboxilesterases, que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila constituída por mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são denominadas genericamente como esterases (THEIL, 1995; VERGER, 1997; REIS *et al.*, 2009; GHALY *et al.*, 2010; SCHRECK; GRUNDEN, 2013).

Esse grupo de enzimas possui diversas aplicações industriais, através de sua utilização na produção de alimentos, detergentes (hidrólise de gorduras), cosméticos (remoção de lipídeos), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas). Também são utilizadas como biocatalisadores ideais em química orgânica, química fina (síntese de ésteres), indústria farmacêutica e na

produção de aditivos alimentares (intensificação de aromas) (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; TREICHEL *et al.*, 2010; ANBU *et al.*, 2013; LOU *et al.*, 2013; CIRIMINNA; PAGLIARO, 2013; SHARMA; KANWAR, 2014).

As lipases microbianas são consideradas versáteis, pois apresentam uma série de vantagens em relação às lipases produzidas por células animais e vegetais (SETH *et al.*, 2014), que vão de um elevado rendimento de conversão do substrato em produto, têm grande versatilidade de adaptação às condições ambientais e apresentam grande capacidade de realizar reações de catálise em condições extremas de temperatura e pH e solventes orgânicos com quimio-, regio- e enantioselectividade (BERGLUND, 2001; MURALIDHAR *et al.*, 2002; JAEGER; EGGERT, 2002; JAEGER; EGGERT, 2004; MESSIAS *et al.* 2011; NAGAR; DWIVEDI; SHRIVASTAVA, 2013; NIGAM, 2013; SHARMA; KANWAR, 2014).

A estrutura química e as características cinéticas das lipases microbianas produzidas variam dependendo do microrganismo, gênero, espécie e da composição do meio de produção utilizado (BENJAMIN; PANDEY, 2001; TAVARES *et al.*, 2011, MASSADEH; SABRA, 2011; GOCHEV *et al.* 2012; GARCIA-GALAN *et al.*, 2013; FICKERS; NICAUD, 2013). A seleção adequada dos nutrientes presentes na elaboração dos meios de produção de lipase envolve uma série de estudos prévios para introdução de substratos que quimicamente sejam constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes para que ocorra uma maior produção. Os substratos naturais utilizados na composição de meios de produção de lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes, enquanto esterases atuam sobre um único tipo de ligação éster, liberando ácidos graxos de baixo peso molecular (PAHOJA; SETHAR, 2002; BORNSCHEUER;

KAZLAUSKAS, 2004; HULT; BERGLUND, 2007; RAY, 2012). Deve-se enfatizar que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (GHOSH *et al.*1996; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999(FOI INTRODUZIDO NA BIBLIOGRAFIA); PANDA; GOWRISHANKAR, 2005; SALIHU; ALAM, 2012; JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013).

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

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

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas culturas de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* sp isolados da Caatinga de Pernambuco, denominados de SIS 10, 11,14, 15 e 16, previamente catalogados no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), localizado no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB). As culturas foram mantidas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), com a seguinte composição: dextrose (40 g/L),

peptona (10 g/L), ágar (20 g/L), água destilada 1000 mL e pH 7,0.

2.2 SELEÇÃO DE AMOSTRAS PRODUTORAS DE LIPASE

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

2.3 PRÉ INÓCULO

A contagem do número de esporos e células em suspensão foi realizada em câmara de Neubauer e microscópio binocular, utilizando-se volumes de 25 mL da suspensão, quantificados no valor de 10⁷ UFC/mL, em meio caldo Sabouraud.

2.4. SELEÇÃO DE MEIOS DE PRODUÇÃO

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

Meio 1 (g/L): Glicose (0,1), MgSO₄.7H₂O (0,2), K₂HPO₄ (0,7), extrato de levedura (0,4), óleo de oliva (0,20), pH 6,5;

Meio 2 (g/L): óleo de oliva (0,30), peptona (70), NaNO₃ (1), KH₂PO₄ (1), MgSO₄.7H₂O (0,5), pH7,0;

Meio 3 (g/L): NaNO₃ (0,05), MgSO₄.7H₂O (0,05), KCl (0,05), KH₂PO₄ (0,2), extrato de levedura (0,1), peptona (0,5), óleo de oliva (0,1), pH 5,5;

Meio 4 (g/L): Glicose (0,25); MgSO₄.7H₂O (0,05); K₂HPO₄ (0,175); Extrato de levedura (0,1); Óleo de Oliva (0,5); pH=7;

Meio 5 (g/L): Peptona (17,5); NaNO₃ (0,25); KH₂PO₄ (0,25); MgSO₄.7H₂O (0,125); Óleo de Oliva (7,5); pH=7;

Meio 6 (g/L): NaNO₃ (0,0375); MgSO₄.7H₂O (0,0375); KCl (0,0375); KH₂PO₄ (0,15); extrato de levedura (0,075); peptona (0,0375); Óleo de Oliva (0,25); pH=7.

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

2.5 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA

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

2.6. DETERMINAÇÃO DO PH

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

2.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A atividade lipolítica das amostras fermentadas foi detectada através da metodologia descrita por Soares

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

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

2.8. CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

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

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

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

V_a é o volume da amostra titulada (mL);

V_b é o volume da amostra utilizado na reação (mL);

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

t é o tempo de reação em minutos;

V_c é o volume da amostra utilizada na reação (mL).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados ensaios de detecção da atividade lipolítica em meio sólido, com duas amostras isoladas da Caatinga de Pernambuco (SIS 10, 11, 14, 15 e 16), através da metodologia de Hankin, Anagnostakis

(1975). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 1 e a formação do halo característico na Figura 1.

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

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

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

Na figura 1, estão demonstrados a ausência de formação do halo característico e a sua produção. Colen (2006) descreve que alguns microrganismos crescem em temperaturas entre 25-37°C e produzem metabólitos de interesse biotecnológico. Soares *et al.* (2010) descreveram que, utilizando-se linhagens de *Aspergillus sp*, demonstraram-se valores enzimáticos < 2,0, relatando que esses valores indicam um baixo potencial enzimático, considerando que um microrganismo bom produtor de enzimas extracelulares é classificado com índice enzimático ≥ 2,0.

Os fungos filamentosos compõem o grupo microbiano com um elevado número de espécies descritas na literatura e apresentam imensa variedade morfológica

e elevado potencial bioquímico e fisiológico. Treichel *et al.* (2010) descrevem que o gênero *Aspergillus* se destaca por apresentar um elevado potencial biotecnológico na produção de bioprodutos de alto valor agregado, principalmente as enzimas microbianas.

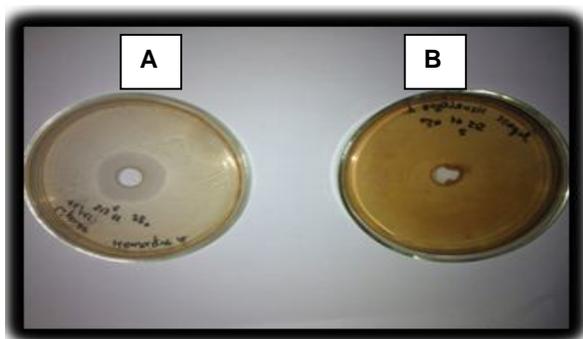


Figura 1. Detecção de lipase: (A) formação de halo lipolítico, (B) ausência de formação de halo lipolítico.

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

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

A Tabela 2 contém os valores obtidos da produção lipolítica em diferentes meios testados para a amostra SIS 10. O óleo de oliva foi utilizado como principal indutor para a produção da atividade lipolítica, influenciando a produção da enzima, pois a interação com os reagentes adicionados utilizados na composição do meio com o microrganismo produziu a

quebra das ligações das cadeias de ácidos graxos presentes, favorecendo a produção da enzima.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

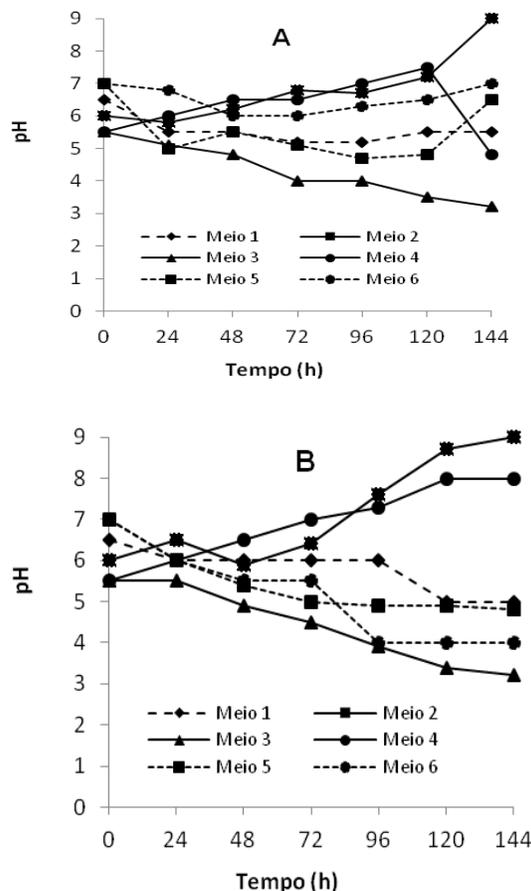


Figura 2 Determinação do pH nos meios de produção por *Aspergillus sp* SIS 10 (A) e SIS 16 (B) em 144 horas a 28°C.

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

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A grande potencialidade das aplicações das lipases nos diferentes ramos industriais, principalmente devido às características diferenciadas apresentadas

pelos diversos microrganismos produtores, justifica a procura por novas amostras produtoras dessa enzima, principalmente de ambientes ainda pouco estudados, como a região da Caatinga.

Destaca-se a habilidade da amostra isolada *Aspergillus* sp (SIS 16) em hidrolisar os ácidos graxos presentes na composição dos meios estudados, através da quebra das ligações ésteres tríplices, transformando-os na enzima estudada.

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, n.4, p.117-139, 2014.

AKOH, C. C. *et al.* GDSL family of serine esterases/lipases. **Progress in Lipid Research**, v.43, n.6, p. 534-552, 2004.

ANBU, P. *et al.* Microbial enzymes and their applications in industries and medicine. **BioMed Research International**, 2 páginas, ID 204014, 2013.

ANDUALEMA, A.; GENESSESSE, A. Microbial lipases and their industrial applications: review. **Biotechnology**, v.11, n.3, p.100-118, 2012.

BASSEGODA, A., CESARINI, S., DIAZ, P. Lipase improvement: goals and strategies. **Computacional and Structural Biotechnology Journal**, v.2, n.3, 8p., 2012.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 2, p213–221, 2001.

BERGLUND, P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. **Biomolecular Engineering**, v.18, n.1, p.13-22, 2001.

BERKA, R. M.; DUNN-COLEMAN, N.; WARD, M. Industrial enzymes from *Aspergillus* species. **Biotechnology**, v.23, p.155-202, 1992.

BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. Catalytic promiscuity in biocatalysis: using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. **Chem. Int. Ed.** 43, 6032–6040, 2004.

CARVALHO, C. M. L.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Kinetic of cutinase catalyzed transesterification in AOT reversed micelles: modeling of a batch stirred tank reactor. **J. Biotechnol.**, v. 81, p.1-13, 2000.

CHAVAN, S. B.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: An appraisal as a product of commercial potential. **Biotechnology Progress**, v.29, n.4, p. 833-846, 2013.

CIRIMINNA, R.; PAGLIARO, M. Green Chemistry in the Fine Chemicals and Pharmaceutical Industries. **Organic Process Research & Development**, v. 17, n. 12, p. 1479-1484, 2013.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Minas Gerais: UFMG, 2006. 206 p. 2006. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado)–Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia da UFMG, Minas Gerais.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista de ciências exatas aplicadas e tecnológicas**, v.4, n.2. p.1-14, 2012.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Mol. Biotechnol.**, v.38, p.41-45, 2008.

- DHILLON, G. S. *et al.* Biotechnological potential of industrial wastes for economical citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* through submerged fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, p.542–548, 2012.
- FICKERS, P.; NICAUD, J. M. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica* lipases: An overview. **Microbiology Monographs**, v.25, p. 121-136, 2013.
- GHALY, A. E. *et al.* Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v.6, n. 2, p.54-76, 2010.
- GARCIA-GALAN, C. *et al.* Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*. **Journal of Molecular Catalysis B; Enzymatic**, v.93, p.34-43, 2013.
- GOCHEV, V. *et al.* Nutritive medium engineering enhanced production of extracellular lipase by *Trichoderma longibrachiatum*. **Biotechnological & biotechnological equipment**. v.26, p.2875-2882, 2012.
- GOSWAMI, S. *et al.* A review on production of echinocandins by *Aspergillus sp.* **J. Biochem Tech.** v.4, n.1, p.568-575, 2012.
- GHOSH, P. K. *et al.* Microbial lipases: production and applications. **Science progress**, v.79, n.2, p.119-157, 1996.
- GOPINATH, S. C. B. *et al.* Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. **BioMed research international**, ID154549, p.1-10, 2013.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.64, p.763-781, 2004.
- GUNASEKARAN, V.; DAS, D. Lipase fermentation: progress and prospects. **Indian journal of biotechnology**. v.4, p.437-445, 2005.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKI, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v.67, p.597 – 607, 1979.
- HARI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource technology**, v.89, p.17-34, 2003.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology advances**. v. 27, p.782-798, 2009.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and microbial technology**, v.39, p.235-251, 2006.
- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.
- HULT, K; BERGLUND, P. Engineered enzymes for improved organic synthesis. **Curr. Opin. Biotechnol.** v.14, p.345-400, 2007.
- IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization — Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v.43, p. 1019-1032, 2008.
- JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.53, p. 315-351, 1999.
- JAEGER, K. L.; EGGERT, T. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, n.4, p. 305-313, 2004.
- JAEGER, K. L.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology, **Current Opinion in biotechnology**, v.13, p.390-397, 2002.
- JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production - a literature review. **Journal of Cleaner Production**, n. 42, p.228-240, 2013.
- JOHANNES, T. W.; ZHAO, H. Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. **Current Opinion of Microbiology**, v.9, p. 261-267, 2006.
- LI, S. *et al.* Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Comput. Struct. Biotechnol. J.**, v. 2, p. 1-11, 2012.
- LOTFY, W. A.; GHANEM, K. M.; EL-HELOW, E. R. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. **Bioresource Technology**, v.98, n.18, p. 3464-3469, 2007.
- LOU, L. *et al.* Recent advances in industrial applications of lipases and strategies for improving lipase properties. **Journal of Bioprocess Engineering and Biorefinery**, v.2, n.2, p.117-124, 2013.

- MALDONATO, R. R.; MACEDO, G. A.; RODRIGUES, M. I. Lipase Production Using Microorganisms from Different Agro-Industrial By-Products. **International Journal of Applied Science and Technology**, v.4, n.1, p. 108-115, 2014.
- MASSADEH, M. I., SABRA, F. M. Production and characterization of lipase from *Bacillus stearothermophilus*. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.61, p.13139 -13146, 2011.
- MATA-GOMEZ, M. *et al.* A Novel tannase from the xerophilic fungus *Aspergillus niger* GH1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.9, p.987-996, 2009.
- MESSIAS, J. M. *et al.* Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina : Ciências exatas e tecnológicas**, v.32, n.2, p.213-234, 2011.
- MURALIDHAR, R. V. *et al.* Understanding lipase stereoselectivity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, n.2, p.81-97, 2002.
- NAGAR, M.; DWIVEDI, S. K.; SHRIVASTAVA, D. A review on industrial application in microbial lipases. **International journal of pharmaceutical & research sciences**, v.2, n.4, p.631-641, 2013.
- NIGAM, P.S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications, **Biomolecules**, v.3, p.597-611, 2013.
- ORLANDELLI, R. C. *et al.* Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p. 97-109, 2012.
- PAHOJA, V. M.; SETHAR, M. A. A review of enzymatic properties of lipase in plants, animals and microorganisms. **Pakistan journal of applied sciences**. v.2, n.4, p.474-484, 2002.
- PANDA, T.; GOWRISHANKAR, B.S. Production and applications of esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, n.2, p.160-169, 2005.
- POKORNY, D.; FRIEDRICH, J., CIMERMAN, A. Effect of nutritional on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v.16, n.4, p.363-366, 1994.
- RAY, A. Application of lipase in industry. **Asian Journal of Pharmacy and Technology**. V.2, n.2, p.33-37, 2012.
- REIS, P. *et al.* Lipases at interfaces: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-148, p.237-250, 2009.
- REKHA, K. S. *et al.* An overview of microbial lipases. **Journal of chemical, biological and physical sciences**. v.2, n.3, p.1379-1389, 2012.
- SALIHU, A.; ALAM, M. Z. Production and applications of microbial lipases: a review. **Scientific research and essays**, v.7, n.30, p.2667-2677, 2012.
- SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical mycology**, v.47, suplemento 1, p. S13-S20, 2009.
- SATOH, T. *et al.* Current progress on esterases: from molecular structure to function. **Drug metabolism and Disposition**, v.30, n.5, p.488-493, 2002.
- SCHRECK, S. D.; GRUNDEN, A. M. Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 1846-1859, 2013.
- SETH, S. *et al.* An insight into plant lipase research-challenges encountered, **Protein Expression and Purification**, v.95, p.13-21, 2014.
- SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic solvent tolerant lipases and applications. **The Scientific World Journal**. ID 625258, 15 páginas, 2014.
- SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied biochemistry and biotechnology**, n.166, p.486-520, 2012.
- SOARES, C. M. F. *et al.* Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore sílica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.79, n.77, p.745-757, 1999.
- STERGIOU, P. Y. *et al.* Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v.31, n.8, p.1846-1859, 2013.
- TAVARES, L. L. P. *et al.* Seleção de diferentes meios para produção de lipase a partir de *Bacillus licheniformis* (UCP 1014). **Revista Exacta**, v.9, n.3, p.157-165, 2011.
- THAKUR, S. Lipases, its sources, properties and applications: a review. **International Journal of Scientific & Engineering Research**. V.3, n.7, p.1-40, 2012.
- THEIL, F. Lipase-supported synthesis of biologically active compounds, **Chemical Reviews**, v. 95, n.6, p. 2203–2227, 1995.
- TREICHEL, H. *et al.* A review on microbial lipases production. **Food and bioprocess technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

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

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

WARD, O. P. *et al.* Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. **Advances in Applied Microbiology**, v.58, p.1-75, 2005.

ZHAO, P. *et al.* Screening and identification of a novel lipase producing *Aspergillus niger* Yz15 and optimization for lipase production. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, n.5, n.12, p. 418-424, 2013.