

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL -
MESTRADO**

Mario Augusto Alexandre Coelho

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUO DE PÓ DE FUMO E SEBO
BOVINO PARA PRODUÇÃO DE LIPASE DE *Aspergillus niger* USP
898 POR FERMENTAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

Santa Cruz do Sul, Maio de 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Mario Augusto Alexandre Coelho

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUO DE PÓ DE FUMO E SEBO
BOVINO PARA PRODUÇÃO DE LIPASE DE *Aspergillus niger* USP
898 POR FERMENTAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Santa Cruz do Sul, Maio de 2009

Mario Augusto Alexandre Coelho

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUO DE PÓ DE FUMO E SEBO
BOVINO PARA PRODUÇÃO DE LIPASE DE *Aspergillus niger* USP
898 POR FERMENTAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

Esta Dissertação foi submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado, Área de Concentração Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC
Orientador

Dra. Rosana de Cassia de Souza Schneider

Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC

Dra. Patrícia Valente da Silva

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

RESUMO

O presente trabalho objetivou estudar a utilização de resíduos de pó de fumo e sebo bovino para a atividade lipase de *Aspergillus niger* em fermentação em fase sólida. Oito cepas de *A. niger* foram testadas em tubos de ensaio contendo ágar lipase para a seleção da cepa mais produtiva, sendo a cepa *Aspergillus niger* USP 898 a que apresentou melhor resultado. Dentre as três faixas de granulometria de pó de fumo utilizadas para a produção de lipase, em micro escala, a faixa de 24 – 48 mesh se mostrou mais efetiva. Para produção de lipase em macro escala, uma alíquota de 500 mL de suspensão de esporos do fungo selecionado foi distribuída em seis recipientes plásticos contendo cada um 5 kg de pó de fumo e 2 kg de sebo bovino previamente autoclavados a 120 °C por 15 min. Deste material incubado a 28 °C – 32 °C foram recolhidas amostras para a determinação de atividade de lipase, proteínas totais e gordura residual em função do tempo durante o cultivo em fase sólida por 63 dias. A atividade lipolítica mostrou ser dependente do tempo, apresentando picos característicos de produção em diferentes períodos do experimento. O consumo constante de sebo bovino até o fim do experimento mostra sua importância como indutor da produção de lipase. Desta observação pode-se concluir que o resíduo de pó de fumo e o sebo bovino apresentam potencial para, como substrato, possibilitar a produção de lipase em fase sólida. O baixo custo para obtenção do pó de fumo e sebo bovino é um fator importante para tornar a produção de lipase viável.

Palavras chave: *Aspergillus niger*, pó de fumo, lipase, sebo bovino, resíduo sólido.

ABSTRACT

This work aimed to assess the lipase activity of *Aspergillus niger* USP 898 on tobacco dust in solid state fermentation (SSF). Eight strains of *A. niger* were assessed in test tubes with agar lipase to select the most productive. The *Aspergillus niger* USP 898 had the better result. Among the three different granule sizes of tobacco dust, to produce lipase in micro scale, the best result was obtained with the 24 – 48 mesh. In macro scale six containers containing well mixed 5 kg of tobacco dust with 2 kg of tallow oil, previously autoclaved at 120 °C during 15 min, received the aliquot of 500 mL of spores suspension of the selected fungus. This material, incubated at 28 °C – 32 °C, was the source for the lipase activity, residual fat and total proteins determinations. The SSF trial was conducted along 63 days. The lipase activity showed to be dependent of the time exhibiting characteristic peaks of production during the assay. The consumption of the tallow occurred from the beginning until the end of the experiment, proving to be important to induce the lipase activity. The low cost to obtain the Tobacco dust and tallow is an important factor to turn the lipase production economically viable.

Words key: *Aspergillus niger*, tobacco dust, lipase, tallow oil, solid waste.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa da Região Sul com principais números do setor.....	15
Figura 2 – Perfil do produtor de fumo – área média por propriedade 16,8 ha.....	16
Figura 3 – Produção média de fumo do Brasil e dos principais estados produtores – 1998 a 2000 e 2001 a 2003.....	17
Figura 4 – Cadeia produtiva do tabaco.....	18
Figura 5 – Fases do processo de degradação anaeróbia.....	21
Figura 6 – Fluxograma da metodologia empregada para a obtenção de lipase de <i>Aspergillus niger</i> USP 898 por fermentação em fase sólida de sebo bovino e pó de fumo.....	33
Figura 7 – Análise bromatológica de amostras de pó de fumo.....	43
Figura 8 – Avaliação da atividade lipase em coluna das cepas (a) <i>Aspergillus niger</i> USP 4, (b) <i>Aspergillus niger</i> USP 9, (c) <i>Aspergillus niger</i> USP 9', (d) <i>Aspergillus niger</i> USP10, (e) <i>Aspergillus niger</i> USP11, (f) <i>Aspergillus niger</i> CMMI 111, (g) <i>Aspergillus niger</i> USP 336, e (h) <i>Aspergillus niger</i> USP 898.....	45
Figura 9 – Gráfico ilustrativo da variância de atividade lipolítica com diferentes granulometrias relacionada ao tempo de incubação.....	46
Figura 10 - <i>Recipientes</i> com substrato (pó de fumo + sebo bovino) colonizado pelo <i>A. niger</i> USP 898.....	48
Figura 11 – Perfil de atividade lipase em função do tempo durante fermentação em fase sólida de sistema pó-de-fumo/sebo bovino por <i>Aspergillus niger</i> USP 898.....	49

Figura 12 – Percentual de gordura residual em função do tempo durante fermentação em fase sólida de sistema pó-de-fumo/sebo bovino por <i>Aspergillus niger</i> USP 898.....	50
Figura 13 – Teor de Proteína em função do tempo durante fermentação em fase sólida de sistema pó-de-fumo/sebo bovino por <i>Aspergillus niger</i> USP 898.....	51
Figura 14 – Avaliação quantitativa da atividade lipase do isolado <i>Penicillium</i> sp. A12 C/S 4. Fonte: Macagnan (2007).....	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Classificação do Tabaco em Folha, Curado – Quadro Sinóptico.....	14
TABELA 2 – Fumicultura brasileira. Importância Social.....	16
TABELA 3 – Característica química do resíduo de tabaco.....	19
TABELA 4 – Parâmetros selecionados para o processo de formação do Biogás.....	22
TABELA 5 – Substâncias inibidoras do processo de decomposição anaeróbio.....	23
TABELA 6 – Reagentes utilizados durante o desenvolvimento do trabalho.....	34
TABELA 7 – Curva analítica de determinação de açúcares totais redutores em pó de fumo.....	37
TABELA 8 – Análise bromatológica (em composição ponderal, %) de amostras de pó de fumo.....	44

SUMÁRIO

<u>2.1.1 Reagentes utilizados.....</u>	<u>32</u>
<u>.....</u>	<u>32</u>
2.8 Determinação de proteínas totais.....	39

INTRODUÇÃO

O biodiesel assumiu importância substancial como alternativa energética após receber incentivos governamentais para sua produção. Esta decisão política de estimular a produção de biocombustíveis tem origem no fato de haver uma pressão internacional para o desenvolvimento de tecnologias limpas de produção de energia, que substituam as fontes tradicionais causadoras do efeito estufa.

Conforme Fukuda et al. (2001) vários processos para a produção do biodiesel tem sido desenvolvidos. Dentre estes a transesterificação usando a catálise básica apresenta altos níveis de conversão de triacilgliceróis para os seus correspondentes ésteres metílicos em reações de curta duração. Por isso, este processo tem sido utilizado para a produção de biodiesel em vários países. Recentemente, a transesterificação enzimática com utilização de lipase se tornou mais atrativa para a produção do biodiesel. Os autores citam ainda que a única restrição deste sistema de produção é ainda o custo elevado de produção de lipase.

A Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, através de um grupo de trabalho que conta com estagiários, mestrados em tecnologia ambiental, professores, pesquisadores, está estudando sobre métodos para obtenção de lipase de origem microbiana. Embora o objetivo principal seja pesquisar a viabilidade técnica de produção desta enzima, para sua utilização na produção de biodiesel, a utilização de substratos de baixo custo é imprescindível para o prosseguimento dos estudos, por razões já supracitadas. Dentre os substratos utilizados até agora estão: grama e sebo bovino em fermentação em fase sólida (FFS) (Macagnan, 2007), substrato peptona e Tween 80 acrescido ou não de extrato de pó de fumo em fase sólida e fase submersa (Schimuneck, 2007) e sebo bovino e pó de fumo em FFS (Bjerk, 2008).

O presente trabalho procurou avaliar a utilização de *Aspergillus niger* para a produção de lipase sobre pó de fumo e sebo bovino em fase sólida. Estes resíduos são encontrados com facilidade em nossa região, sendo que o pó de fumo, gerado

pela indústria fumageira, tem no transporte o único custo para sua aquisição. Já o sebo bovino quando adicionado ao pó de fumo, em estudo preliminar realizado por Bjerk (2008), provou ser uma alternativa viável para produção de lipase por mostrar resultados que não diferem daqueles apresentados pelo pó de fumo mais nutrientes. Dentre os substratos lipídicos, é o mais barato existente no mercado regional. Já o fato de ter-se optado em trabalhar com fermentação em fase sólida é devido ao fato desta ser mais econômica que a submersa (Castilho et al., 1999).

O objetivo geral deste trabalho foi o de aproveitar o resíduo de pó de fumo e o sebo bovino para produção de lipase de *Aspergillus niger* USP 898 por fermentação em fase sólida. O trabalho contou com os seguintes objetivos específicos:

- Selecionar cepa de *Aspergillus niger* adaptada à produção de lipase usando pó de fumo e sebo bovino como substrato.
- Avaliar o efeito da granulometria do pó de fumo sobre a produção de lipase pela cepa de *Aspergillus niger* selecionada.
- Acompanhar a evolução da produção de lipase de *Aspergillus niger* USP 898 em função do tempo.
- Avaliar o teor de gordura residual durante a fermentação em fase sólida.
- Avaliar o teor de proteínas totais durante a fermentação em fase sólida.

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Pó de fumo

Apesar de toda pressão política exercida nas últimas décadas contra o cigarro, o setor fumageiro permanece forte e contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento econômico do estado do Rio Grande do Sul.

Bem estruturada economicamente, a indústria fumageira se faz presente nos três estados do sul do Brasil, em quase 800 municípios (Sindifumo, 2008), através de um sistema integrado de produção que atende a milhares de agricultores na zona rural. Com uma logística adequada, o fumo, produzido pela agricultura familiar, chega à indústria onde é processado e armazenado para a exportação e/ou comercialização no mercado nacional. O principal resíduo industrial desta atividade é o pó de fumo.

Segundo a PORTARIA Nº 016, de 19 de janeiro de 1982, do Ministério da Agricultura, para classificação de resíduos gerados no processamento de Tabaco, o pó de fumo já foi denominado como sendo “constituído dos resíduos finais provenientes da destala mecânica e que compreende o pó e resíduos de tamanho ínfimo, estes últimos não enquadráveis em SC” (SC – fragmentos de folhas sem talo, de tamanho não superior a 10 (dez) milímetros quadrados).

Em 13 de abril de 2007 a legislação sobre a classificação do tabaco em folha, curado, foi alterada. Nesta última regulamentação de identidade, qualidade, embalagem, marcação e apresentação do tabaco em folha curado, definida pela Instrução Normativa nº 10, (Diário Oficial da União, 17 de abril de 2007, Seção I) não mais aparece a definição de pó de fumo. Aparecem classificados como resíduos apenas as denominações “SC” e “ST”. Sendo que “SC” é constituído de fragmentos de lâminas maiores que 1,56 cm², isentos de talos e "ST" constituído de fragmentos de talos com mais de 4 cm de comprimento. Portanto sob os olhos da legislação a

denominação “pó de fumo”, que compreende o pó e resíduos de tamanho ínfimo, passa a não ser mais definida como tal.

Com isso a classificação do fumo passa a ser conforme a tabela 1, do anexo II da Instrução Normativa número 10:

Tabela 1 - Classificação do Tabaco em Folha, Curado – Quadro Sinóptico

Classificação	Tabaco em Folha Curado	
Grupos	TE - Tabaco de Estufa	TG - Tabaco de Galpão
Subgrupos	FM e FS	FM e FS
Classes	X, C, B e T	X, C, B e T
Subclasses	O, R e L	L
Tipos	1, 2 e 3	1, 2 e 3
Subtipos	K, G2, G3 e N	K, G e N
Resíduos	SC e ST	-

Fonte: Instrução Normativa nº10, 2007. Ministério da Agricultura.

1.1.1 Aspectos de produção

De forma muito representativa, o setor abrange um total de 182 mil famílias de pequenos agricultores distribuídos em 780 municípios da região sul (Figura 1). É uma atividade que tem influência positiva sobre a economia destas áreas produtoras, remunerando o trabalho da agricultura familiar o suficiente para sustentar em torno de 800 mil pessoas no meio rural. Para uma produção estimada em 678 mil toneladas de fumo, safra 2007/2008, foram plantados 344 mil hectares de terra. Esta atividade faz com que a indústria absorva 30 mil pessoas nos seus quadros funcionais, contribuindo desta forma para geração de emprego também no meio urbano.



Figura 1 - Mapa da Região Sul com principais números do setor.

Fonte: SINDIFUMO (<http://www.sindifumo.com.br/>)

Segundo o SINDIFUMO (2008) em 2007 as exportações do setor alcançaram 700 mil toneladas e divisas da ordem de US\$ 2,2 bilhões/FOB. Este resultado com a comercialização do tabaco faz com que circule entre os plantadores de fumo o equivalente a R\$3,2 bilhões.

Considerando todo o setor produtivo, como aquisição de insumos, transporte, pagamento de funcionários, energia e toda gama de atividades relacionadas à produção, a movimentação financeira gerada nesta cadeia supera os R\$ 10 bilhões (Sindifumo, 2008).

Com relação ao número de pessoas envolvidas, de acordo com a AFUBRA (2008), “o setor fumageiro presta importante contribuição social envolvendo mais de 2,4 milhões de pessoas no processo. Com isso, ameniza o desemprego, uma das grandes preocupações mundiais” (Tabela 2).

Tabela 2 - Fumicultura brasileira. Importância Social.

Descrição	Safra: 2006 / 07		Total	%
	Diretos	Empregos Indiretos		
Lavoura	925.000		925.000	38,5
Indústria	35.000		35.000	1,5
Diversos		1.440.000	1.440.000	60,0

TOTAL	960.000	1.440.000	2.400.000	100
-------	---------	-----------	-----------	-----

Fonte: AFUBRA. 2008. <http://www.afubra.com.br>

De acordo com a estatística realizada pela AFUBRA sobre o perfil do produtor de fumo, (Figura 2) fica visível que esta é uma atividade quase que estritamente apropriada para a pequena propriedade rural.

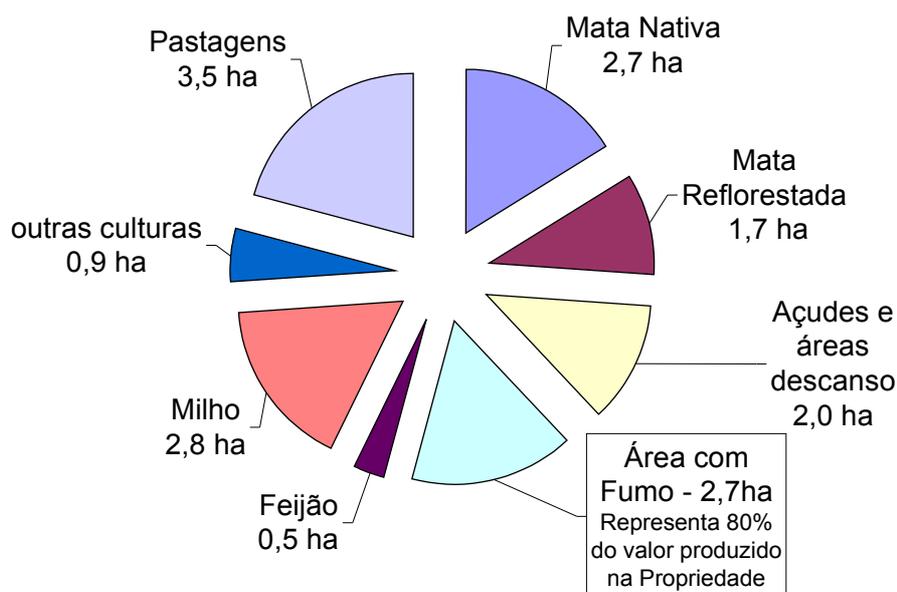


Figura 2 - Perfil do produtor de fumo – área média por propriedade 16,8 ha.

Fonte: AFUBRA. 2008. <http://www.afubra.com.br>

A área média utilizada nesta atividade é de 16,8 ha. Deste total são utilizados 2,7 ha para a produção do tabaco, que é responsável por 80% da renda do agricultor. O espaço destinado à preservação de mata nativa e reflorestamento representa em média 26,8% das áreas. Açudes e áreas de descanso, somados às áreas de pastagens, ocupam 32,7% das propriedades. Milho, feijão e outras culturas são produzidos em um espaço equivalente a 2,8 ha, 0,5 ha e 0,9 ha em média, respectivamente, por estes agricultores familiares (AFUBRA, 2008).

Para se ter uma noção do volume de fumo em folha produzido no Brasil e sua distribuição geográfica, a Figura 3 mostra que a região sul é realmente o principal produtor de tabaco do país, com 96% do total.

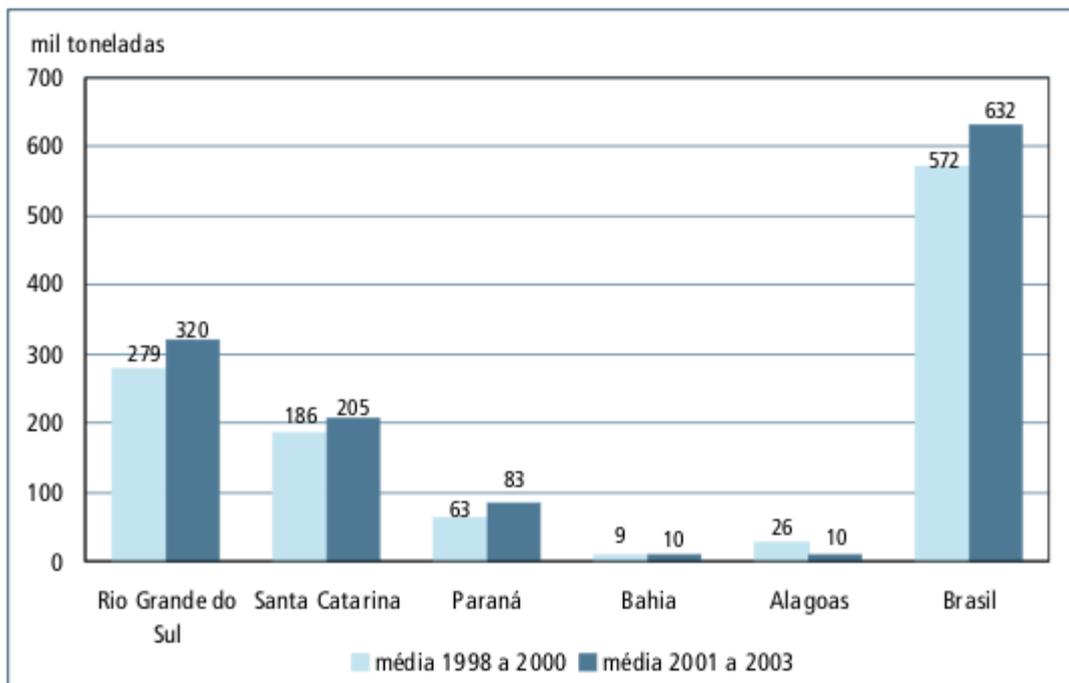


Figura 3 - Produção média de fumo do Brasil e dos principais estados produtores – 1998 a 2000 e 2001 a 2003

Fonte: Atlas Econômico do Rio Grande do Sul.

Somente o Rio Grande do Sul produz em torno de 50% deste total, sendo desta forma o principal produtor brasileiro, seguido por Santa Catarina, 32% e o Paraná com 13%. Todo este volume produzido é quase que totalmente processado na cidade de Santa Cruz do Sul, RS. Este fato faz com que haja uma grande produção de resíduos desta atividade neste município. Não existem dados oficiais sobre a quantidade gerada de resíduo, mas informalmente o setor informa que esta quantia possa chegar à soma de 60.000 toneladas por ano.

Visualizando os elos da cadeia produtiva do fumo, conforme organograma da Figura 4 (AFUBRA, 2008), há a possibilidade de vários impactos ambientais decorrerem desta atividade.

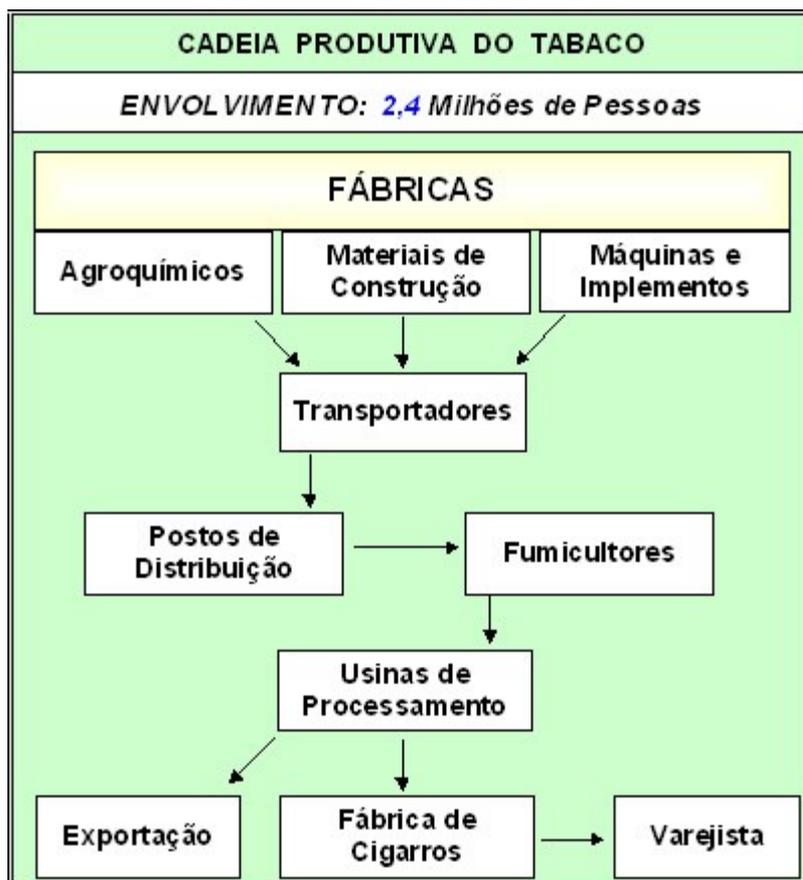


Figura 4 - Cadeia Produtiva do Tabaco.

Fonte: AFUBRA. 2008. <http://www.afubra.com.br>

Entre os impactos relacionados à produção de fumo destaca-se o impacto negativo da geração de pó de fumo na etapa industrial. Sua destinação tem sido a lavoura dos fumicultores. Por esta razão o setor fumageiro vem buscando soluções economicamente viáveis para minimizar os impactos causados pela adição do pó de fumo ao solo, sem um tratamento adequado para tal.

1.1.2 Experiências de biorremediação de pó de fumo

Embora em um número reduzido, algumas alternativas já foram testadas para processar este resíduo de forma a garantir seu retorno ao meio ambiente de forma segura. Dentre estas alternativas estão os trabalhos que mostram a degradação

dos resíduos, da folha de fumo processada, por processo anaeróbio (Meher et al., 1994; Civillini, 1997). O fato de haver poucos trabalhos sobre a degradação do pó de fumo é devido a uma diversidade grande de fatores que influenciam os dois processos citados e que, por isso, torna-os difíceis de serem trabalhados por um setor que concentra um número reduzido de empresas como é o da indústria fumageira.

A literatura sobre degradação anaeróbia de pó de fumo é bastante limitada. Um estudo concluído na Índia (Meher et al., 1994), no Tata Research Design and Development Center, mostrou que a degradação anaeróbia de resíduos de fumo consegue reduzir 60% da DQO, 80% da DBO e em até 75% o teor de nicotina, cuja concentração varia de 3 a 4%, como mostra a Tabela 3. Isto demonstra a habilidade de certas bactérias em degradar a nicotina.

Tabela 3 - Característica química do resíduo de tabaco

Constituinte	Porcentagem
Sólidos Totais	97,2
Sólidos Voláteis (perdidos na queima)	71,9
Carboidratos totais	25-50
Proteína	2,7-4,8
Teor Mineral	12-45
Nicotina	3-4
Cinzas	25

Fonte: Meher et al. (1994)

Em trabalho realizado na Itália, por Civillini (1997), a bactéria *Pseudomonas putida* foi identificada como sendo a de melhor desempenho na degradação de nicotina, quando comparada com *Arthrobacter oxidans* α 2 e *Arthrobacter oxidans* pAO1. Trabalhos como estes demonstram que a possibilidade de degradar o pó de fumo é plenamente possível.

Utilizando pó de fumo, Schimunek (2007) comparou seis amostras de *Aspergillus* sp. quanto ao potencial de crescimento micelial radial e produção de atividade lipase. Este estudo foi realizado em função do tempo durante cultivo em meio específico (fase sólida e fase submersa) para indução de atividade lipolítica à base de substrato peptona e Tween 80 acrescido ou não de extrato de pó de fumo.

Os resultados indicaram que a adição de extrato de pó de fumo aumenta em algumas amostras a velocidade de crescimento micelial radial e a atividade lipolítica para a maioria (cinco) das amostras cultivadas em fase submersa, com exceção da cepa de *A. fumigatus* USP 174. Por outro lado, nos cultivos em fase sólida não há melhora na produção de lipase com as cepas analisadas.

1.1.2.1 Degradação anaeróbia

A degradação anaeróbia apresenta peculiaridades relativas ao processo de decomposição que são difíceis de serem controladas quando não há uma tecnologia apropriada disponível para tal. Por isso os projetos desenvolvidos para a decomposição de resíduos orgânicos sem a presença de oxigênio se tornam caros (Landertshammer, 2006).

As fases da fermentação anaeróbia são bem definidas. Segundo Chernicaro (1997), citado por Sprenger (2005), “o processo de fermentação anaeróbia tem quatro fases distintas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese” como mostra a Figura 5 (Landertshammer, 2006).

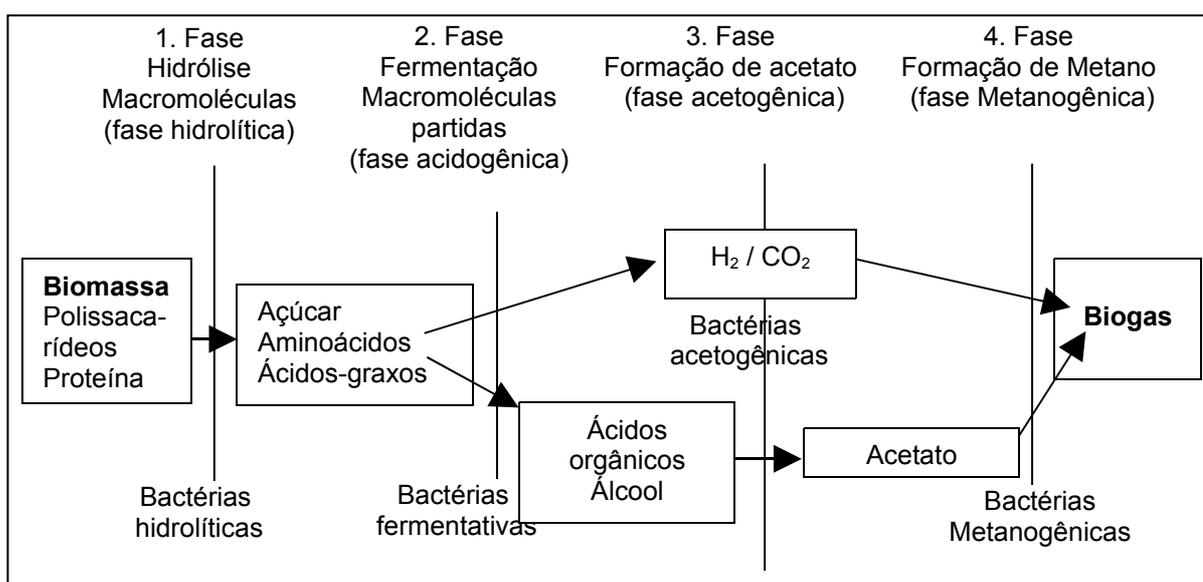


Figura 5 - Fases do processo de degradação anaeróbia.

Fonte: Kaltschmitt et al., 2001.

HIDRÓLISE – Nesta primeira fase o sistema é dominado por bactérias que fazem a quebra de polímeros, tais como proteínas, gorduras, celulose, em monômeros, como ácidos graxos e aminoácidos. Estas bactérias hidrolíticas fazem este trabalho através de suas enzimas extracelulares.

ACIDOGÊNESE – Nesta fase os monômeros são atacados pelas bactérias fermentativas degradando-os até ácidos orgânicos e álcoois, bem como gás carbônico e hidrogênio. Os produtos da fermentação serão influenciados pela concentração do hidrogênio formado. Quanto maior for a pressão parcial do hidrogênio, tanto menor será a formação de ácido acético. Haverá mineralização das ligações orgânicas de nitrogênio e enxofre em NH_3 e H_2S . Se isto acontecer em concentrações elevadas, poderá ocorrer inibição da formação de metano.

ACETOGÊNESE – nesta terceira fase os ácidos orgânicos e álcoois formados anteriormente irão formar ácido acético, hidrogênio e dióxido de carbono. Esta fase é a última antes do início da metanização. Aqui também há uma forte dependência da pressão parcial do hidrogênio.

METANOGÊNESE – quarta e última fase, acontece em condição estritamente anaeróbia. Uma parte das bactérias metanogênicas transforma o hidrogênio e o dióxido de carbono em metano, e outra parte forma metano a partir do acetato. Segundo Delweg (1987), citado por Theiβing (2006), 70% do metano formado provêm da degradação do acetato. Importante ressaltar, também, é que conforme Kaltschmitt et al. (2001) citado por Landertshammer (2006), 55 a 70% do Biogás formado é metano (CH_4) e 30 a 45% é CO_2 . Pode haver uma pequena parte de nitrogênio e oxigênio dentre os gases contidos no Biogás.

Na Tabela 4, abaixo, existem parâmetros importantes no processo de formação do Biogás que devem ser observados.

Tabela 4 - Parâmetros selecionados para o processo de formação do Biogás.

Parâmetros	Hidrólise / Acidificação	Metanização
Temperatura	25 – 35°C	Mesófilo: 32 – 42°C Termófilo: 50 – 58°C
Valor do pH	5,2 – 6,3	6,7 -7,5
Potencial Redox	- 300mV até + 400mV	< - 250 mV
Teor de sólidos	< 40% substância seca	< 30% substância seca
Relação C / N	10- 45	20 -30
Necessidade em Nutrientes C : N : P : S	500 : 15 : 5 : 3	600 : 15 : 5 : 3
Micronutrientes	Nenhuma exigência	Ni, Co, Mo, Se

Fonte: Weiland (2001), citado por Theiβing (2006).

Os principais parâmetros a serem observados são temperatura e pH. Como mostrado na tabela acima, a melhor temperatura para as três primeiras fases é em torno de 30°C. Já para a fase de formação do metano é em torno de 35°C a 37°C.

Segundo Theiβing (2006), o estágio mesofílico é o mais estável devido à grande variedade de bactérias existente nesta faixa de temperatura. Com relação ao pH, a melhor faixa está entre 6,5 e 7,5. Qualquer variação fora desta faixa induz a formação de produtos intermediários capazes de paralisarem a formação de metano. Se durante a metanização o processo se tornar ácido demais, o reator deve ser esvaziado.

Sobre as substâncias inibidoras do processo anaeróbio, apresentadas na Tabela 5, Theiβing (2006) destaca que,

“Embora o oxigênio seja tóxico para as bactérias estritamente anaeróbias, o fato de haver 4% de ar advindo do fluxo da formação do biogás, no reator de fermentação, não afeta em nada o processo da pré-retirada de enxofre, porque as formadoras de metano se encontram em um ambiente no qual também estão presentes bactérias facultativas anaeróbias. Pelo fato destas consumirem de forma instantânea o oxigênio presente não há nenhuma inibição da formação de metano. Ácidos graxos, ácido sulfídrico e amônia na sua forma indissociável são inibidores da formação de metano. Na presença de ácidos graxos e H₂S livres há inibição quando o pH está baixo, enquanto que a amônia tem sua ação inibitória aumentada com valores de pH altos. Quanto mais alta a temperatura maior o efeito de inibição através da amônia”.

Tabela 5 - Substâncias inibidoras do processo de decomposição anaeróbio

Inibidores	Concentração a partir da qual começa a inibição	Observações
Oxigênio	> 0,1 mg / L O ₂	Inibem as bactérias metanogênicas estritamente anaeróbias.
H₂S	> 50 mg / L H ₂ S	Com o valor de pH decrescendo aumenta a inibição

NH₄⁺	> 3.500 mg / L NH ₄ ⁺	Com o valor do pH aumentando (a partir de pH = 7), e com a elevação de temperatura, aumenta o efeito de inibição.
Ácidos		
Graxos	> 2.000 mg / L Hac	Com o valor do pH decrescendo aumenta o efeito inibidor
Voláteis		
Metais	Cu > 50, Zn > 150,	O efeito inibidor ocorre somente com metais pesados livres.
Pesados	Cr > 100 mg / L	O efeito inibidor ocorre somente com determinadas espécies de
Antibiótico	Nenhum efeito	bactérias sensíveis a determinados produtos específicos de antibióticos.

Fonte: Weiland (2001), citado por Theiing (2006).

Já Dellweg (1987), citado por Theiing (2006) argumenta que,

Outros inibidores como hidrocarbonetos e antibióticos serão levados para o processo através dos substratos utilizados na fermentação. Assim poderiam naturalmente os antibióticos exercerem uma ação inibitória devido ao fato de serem mortais para as bactérias. Através dos antibióticos utilizados na produção animal poderiam algumas bactérias não sobreviverem. Mas isto geralmente não atinge as bactérias metanogênicas.

Estes parâmetros, difíceis de serem controlados, associados às substâncias inibidoras do processo, parecem ser os elementos que impedem um maior investimento por parte do setor fumageiro, para através de uma degradação anaeróbia, encontrar a solução para o problema da decomposição do pó de fumo.

1.1.2.2 Degradação aeróbia

Aparentemente mais simples de ser controlada, a degradação aeróbia se apresenta como uma alternativa mais econômica para degradação da matéria orgânica em geral. Especificamente como alternativa de estabilização do pó de fumo, pode ser visto como uma opção interessante.

Kiehl (1985) discorre sobre a existência de fatores que regem o processo de transformação da matéria orgânica em húmus, através da compostagem aeróbia, que são: microrganismos, umidade, aeração, temperatura e relação carbono /

nitrogênio (C/N). Para que estes fatores possam contribuir para uma boa compostagem certos princípios devem ser seguidos.

Os microrganismos são os responsáveis pela transformação da matéria orgânica crua em matéria orgânica humificada. Conforme a umidade, temperatura, pH, teor de oxigênio e tipo de material que está sendo compostado, estes organismos podem ser favorecidos ou não com relação a sua sobrevivência no meio a ser compostado.

A temperatura é um fator importante e determinante do tipo de microrganismo que hora atua na decomposição. Em função da variação da temperatura os organismos são classificados como sendo psicrófilos, mesófilos e termófilos. À medida que as condições do meio vão se modificando, em função das alterações dos fatores supracitados, as populações de organismos vão morrendo e cedendo espaço para outras que passam a dominar a massa.

Todo o processo biológico necessita da presença de água para que os microrganismos possam se desenvolver. Por isso a umidade é um fator importantíssimo na compostagem. A retenção da umidade na massa depende das características do material a ser compostado e de sua porosidade. Quanto mais finas forem as partículas, menor a presença de ar e, com isso, a possibilidade de a água no meio ocupar os espaços vazios é maior. Como consequência diminui a aeração e o processo biológico da decomposição aeróbia pode ficar prejudicado. O excesso e a falta de umidade são prejudiciais à decomposição da matéria orgânica.

A aeração contribui para que a decomposição ocorra de uma forma mais rápida e para que não tenha o inconveniente do mau cheiro ocasionado quando a degradação ocorre na ausência de oxigênio. O consumo de oxigênio depende da temperatura, da umidade, da granulometria e do tipo de material que está sendo decomposto.

Outro fator que influencia grandemente o processo aeróbio é o aumento ou diminuição da temperatura. Caso o volume da massa a ser processada seja pequeno, não ocorrerá aumento de temperatura de forma significativa devido ao calor gerado pelo metabolismo celular dos organismos se dissipar rapidamente. Desta forma a temperatura não influenciará significativamente a compostagem. Caso o material seja volumoso, apresentando uma grande massa de matéria orgânica, o aumento da temperatura no seu interior será elevado, podendo atingir temperaturas bastante altas de até 80°C. Desta forma, à medida que a temperatura vai aumentando, a diversidade em microrganismos também se alterará. Com a mudança da população de organismo, altera também a velocidade de decomposição. Quanto maior a temperatura, maior a velocidade de decomposição. Normalmente a compostagem aeróbia ocorre nas faixas mesófila (entre 25°C e 45°C – faixa ótima de 30°C a 40°C) e termófila.

A relação carbono nitrogênio (C/N) é muito importante pois os microrganismos absorvem estes nutrientes em uma proporção de trinta partes de carbono para uma parte de nitrogênio. Kiehl (1985) cita ainda que o carbono serve ao organismo como fonte de energia, onde dez partes são incorporadas ao protoplasma celular e vinte partes são eliminadas como gás carbônico. O nitrogênio é assimilado na estrutura do organismo na relação de dez partes de carbono para uma de nitrogênio. Por isso para que uma compostagem ocorra sem interrupções causadas pelo excesso de carbono em relação nitrogênio ou que tenha perdas de nitrogênio devido ao seu excesso na relação com o carbono, o ideal seria que a relação C/N fosse de trinta para um.

1.2 Lipase

Esta enzima tem sido alvo de estudos devido a sua importância em processos industriais. À medida que as tecnologias de produção vão se tornando mais eficientes e baratas, sua utilização pela indústria se tornará mais freqüente.

As triacilglicerol acil-hidrolases (EC 3.1.1.3) são enzimas, denominadas lipases, que atuam preferencialmente na interface água/óleo realizando a catálise da reação de hidrólise de triglicerídeos para glicerol e ácidos graxos livres. Os mais potentes produtores de lipases são os microrganismos, sendo que os fungos são notadamente os que produzem maiores quantidades de enzimas (Christakopoulos et al. 1992, citado por Kamini et al. 1997).

As lipases podem ser usadas em medicamentos (enzimas digestivas) ou ainda como reagentes clínicos. Estão presentes também na indústria alimentícia como enzimas modificadoras de sabor. Nas empresas fabricantes de detergentes são utilizadas como aditivos nos produtos de limpeza e na indústria óleoquímica para a síntese de ésteres e modificação de gordura. Além disso, as aplicações mais recentes de lipase são relativas à aplicação na resolução de misturas racêmicas para produzir compostos opticamente ativos (Rao, 1993, citado por Castilho et al., 1999) e na biodegradação de plásticos (Jaeger, 1995, Mochizuki, 1995, citado por Castilho et al., 1999).

1.2.1 Microrganismos produtores de lipases de interesse industrial

Segundo Zaks e Dodds (1998) citado por Silva (2002), as principais fontes biológicas de enzimas são os fungos filamentosos (60%), bactérias (24%), animais (6%), plantas (4%), leveduras (4%), e *Streptomyces* (2%).

Conforme Rapp P. Backhaus (1992), citado por Mahadik et al. (2002), a maioria das pesquisas têm se concentrado sobre a produção extracelular de lipase, onde uma variedade ampla de organismos são citados.

Em trabalhos realizados com soro de leite para identificação de organismos produtores de lipase, as bactérias, leveduras e fungos filamentosos são os que predominam. Dartora et al. (acessado internet 2008) cita que o principal grupo produtor de lipase isolado foi o das leveduras, dentre os quais os gêneros

Saccharomyces cerevisiae, *Candida utilis* e *Rhodotorula rubra* foram identificados. Com relação às bactérias, identificou-se a *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Já dentre os fungos filamentosos isolados e caracterizados, aparecem os gêneros *Aspergillus* e *Penicilium*.

Vários trabalhos citam a aplicação de lipases bacterianas em processos biotecnológicos, como constatado no trabalho de dissertação de Colen (2006). Ele destaca que as bactérias produtoras de lipase mais importantes para a indústria são as dos gêneros *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Pseudomonas*, sendo que esta última se sobressai em relação às outras. Já com relação às leveduras, Colen (2006) cita o trabalho de Hadeball (1991) que diz que apenas alguns gêneros como *Candida*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis* e *Yarrowia* são capazes de produzir lipase. No entanto a única levedura que produz lipase com aplicações industriais é a da espécie *Candida rugosa*.

Com relação aos fungos, Godtfredsen (1990) e Rubin et al. (1997) em trabalhos citados por Saxena et al. (2002) afirmam que as espécies mais produtivas pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* e *Geotrichum*.

Conforme Lakshmanan (1993) e Yamane (1987), citado por Ellaiah et al. (2001), pode-se dizer que dentre os fungos, os mais importantes produtores comerciais de lipase são: *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus japonicus*, *Mucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus niveus*, *Candida rugosa*, bem como, citado por outros autores, *Aspergillus terreus* (Gulati, 1999), *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. (Yadav et al., 1998).

Dos microrganismos produtores de lipase, os fungos são amplamente reconhecidos como sendo a melhor fonte desta enzima. Por isso são usados preferencialmente para aplicações industriais, em especial na indústria alimentícia. Com relação à produção de lipase, o *Aspergillus niger* é superior a vários outros organismos fúngicos e sua enzima é apropriada para o uso em muitas aplicações industriais (Macris et al., 1996; Fu et al., 1995; citado por Mahadik et al., 2002).

1.2.2 Métodos de obtenção

Os métodos comumente utilizados para obtenção de enzimas são os de fermentação aeróbia, denominado de “fermentação em fase sólida (SSF, do acrônimo *solid state fermentation*)” e fermentação anaeróbia, denominado de “fermentação submersa (SmF, do acrônimo *submerge fermentation*)”.

Conforme descrito por Jaeger et al. (1995), citado por Kamini et al. (1997), a fermentação em fase sólida (SSF) por culturas de fungos resulta em maior produtividade do que fermentação submersa (SmF).

Na comparação entre os métodos SSF e SmF, para a produção de lipase, a fermentação sólida se mostra economicamente mais viável do que a submersa. Um fator que contribui para o baixo custo do processo é a utilização de resíduos agroindustriais, de baixo valor econômico, como substrato (Castilho et al., 1999).

Couto & Sanroman (2004) revisando a literatura afirmou que há poucos trabalhos sobre bio-reatores que operam em condições SSF. Isto se deve ao fato da dificuldade que se tem, neste sistema, de se controlar diferentes parâmetros como aeração e oxigenação, pH, temperatura e umidade. Já no sistema SmF estes parâmetros são comumente controlados. Os fatores mais difíceis de serem controlados no SSF, dentro da massa a ser compostada, são temperatura e umidade. Ainda em sua revisão Couto afirma o que vários pesquisadores confirmaram em seus trabalhos ao compararem os dois sistemas de fermentação: que as enzimas produzidas no sistema SSF são mais estáveis que as produzidas em SmF.

Segundo Gombert et al. (1999), o fator que mais influencia na produção de enzimas são os componentes do meio de cultura, muito mais do que a relação C:N.

Neste mesmo trabalho, comprovou-se que a suplementação de óleo de oliva no substrato resultava em alta atividade de lipase, enquanto que a suplementação com amido resultava em alta atividade de glicoamilase.

1.2.2.1 Fermentação submersa

Na fermentação submersa (SmF) as culturas crescem em um meio aquoso. Os estudos em laboratórios com SmF são feitos em bateladas, como por exemplo, no trabalho realizado por Mahadik et al. (2002). Aqui foram utilizados frascos erlenmeyer de 250mL contendo 70 mL do meio de cultura SOB. Os frascos foram inoculados com esporos (aproximadamente $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$) de culturas crescidas em tubos de ensaio sobre substrato (inclinado) MYG (extrato de malte 0.5%, extrato de levedura 0.25%, glucose 1.0% e agar 2.0%) a uma temperatura de 30°C com agitação em incubadora rotatória (150 – 180 rpm) por diferentes períodos de tempo. Para separação do micélio foi utilizado o método de filtração, sendo que a cultura filtrada foi utilizada como fonte de enzima extracelular. Frascos Erlenmeyer com incubadoras para o controle de temperatura e agitação são os equipamentos frequentemente utilizados para trabalhos em laboratórios com SmF.

Até o final da década de 90, século XX, a maioria dos processos biotecnológicos com finalidade comercial para extração de enzimas eram feitos em fermentação submersa (Castilho et al., 1999).

1.2.2.2 Fermentação em fase sólida

A fermentação em fase sólida (SSF) é definida como qualquer processo de fermentação conduzido em um material não solúvel que age tanto no suporte físico

como no fornecimento de nutrientes na ausência de líquido livre corrente (Pandey, 1992, citado por Couto & Sanroman, 2004).

Há muito tempo, suplementos e aditivos (flavorizantes, conservantes, adoçantes, antioxidantes,...) oriundos de microrganismos são utilizados na fabricação de alimentos. Exemplos que nos remetem à antiguidade são os processos de fermentação do arroz pelo *Aspergillus oryzae* para iniciar o processo “koji” e o do *Penicillium roquefortii* para produção de queijo roquefort. Também na China a fermentação em fase sólida (SSF) tem sido extensamente utilizada para a fabricação de vinho, molho de soja e vinagre (Couto & Sanroman, 2004).

As possibilidades de utilização do SSF na produção de suplementos e aditivos para a indústria de alimentos é cada vez mais abrangente. Vários estudos apontam para as possibilidades de produzir aromas, enzimas (α -amilase, transferase fructosil, lipase e pectinase), ácidos orgânicos (ácido láctico), ácido cítrico e goma xantana (hetero-polissacarídeo, produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris*) (Couto & Sanroman, 2004).

1.3 O gênero *Aspergillus*

Dentre os microrganismos produtores de lipase, o fungo *Aspergillus niger* é o mais conhecido, bem como reconhecidamente seguro para a produção de enzimas a serem utilizadas pela indústria de alimentos (Macris, 1996; Fu, 1995; citado por Mahadik et al., 2002).

Mahadik et al. (2002) cita os trabalhos de Olama & El-Sabaeny (1993) e Kamini (1998) para mencionar os poucos trabalhos existentes sobre a produção de lipase por *A. niger* em SSF, apesar da quase totalidade da literatura sobre sistemas SSF fazer referência a compostagem por fungos. Em seu estudo com *A. niger* NCIM 1207, demonstrou que esta espécie produz lipase, em SmF, induzido pela presença

de óleo, sugerindo que a atividade lipase ocorre na presença de substratos que contenham lipídios em seu meio. Todos os estudos feitos com diferentes cepas de *A. niger* mostram variações na quantidade de lipase extracelular produzida, mas a fonte de carbono lipídico é essencial para a produção da enzima. Em especial, a linhagem *A. niger* 1207 apresentou características interessantes com relação à lipase produzida. Esta se mostrou ativa em um pH 2,5 com 75 a 90% de atividade residual a uma acidez extrema de pH 1,5 e 2,0, respectivamente. Ao passo que a atividade normal, conforme trabalhos citados por Mahadik (2002), para as espécies de *A. niger* girarem em torno de pH 4 e 7 e temperaturas de 40°C e 55°C (Pabai et al., 1995; Namboodiri et al., 2000).

Saxena et al. (2002) cita em seu trabalho, na revisão de literatura, as espécies *A. niger*, *A. oryzae*, *A. carneus* e *A. terreus* como sendo produtoras de lipase.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Delineamento da pesquisa

Dentre uma amostragem de oito cepas de *A. niger*, Bjerk (2008) utilizou o método semi-quantitativo para selecionar a cepa USP 898. O fungo selecionado foi adicionado ao substrato, para condução de um experimento em micro escala durante 14 dias e outro em macro escala durante 63 dias. Para o experimento em

macro escala o substrato foi acondicionado em recipientes de 15 litros, contendo pó de fumo e sebo bovino homogeneizados na proporção de 2,5:1.

O processo de fermentação aeróbio transcorreu normalmente em micro e macro escala. Durante o período de condução dos dois experimentos foi feita análise bromatológica para a determinação dos teores de proteína, cinzas, lipídios, açúcares e umidade em diferentes granulometrias do pó de fumo.

O fluxograma da Figura 6, abaixo, descreve de forma esquemática a metodologia utilizada para a condução deste experimento.

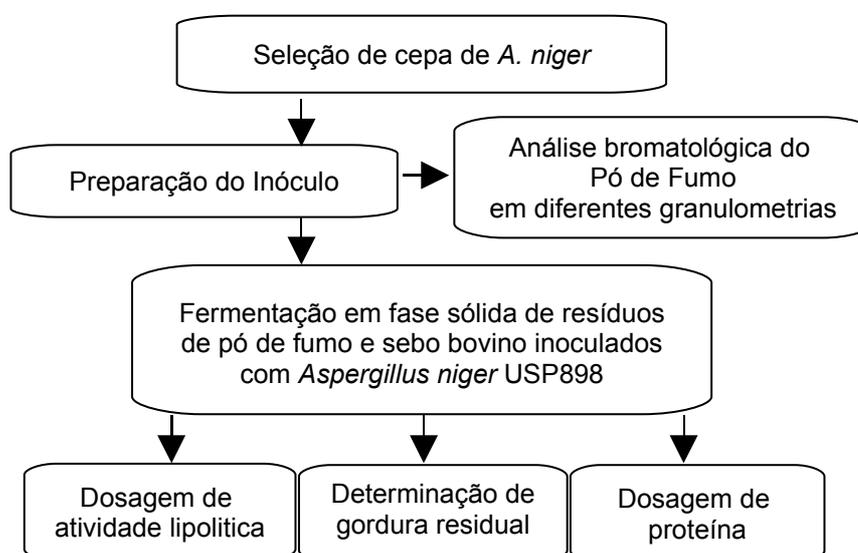


Figura 6 - Fluxograma da metodologia empregada para a obtenção de lipase de *Aspergillus niger* USP 898 por fermentação em fase sólida de sebo bovino e pó de fumo.

2.1.1 Reagentes utilizados

Os reagentes utilizados encontram-se discriminados na Tabela 6.

TABELA 6 - Reagentes utilizados durante o desenvolvimento do trabalho.

Descrição	Marca	Lote
Hidróxido de sódio	Dinâmica	23460
Tween 80	Vetec	0701743
Tampão pH = 10,0	Synth	59837
Tampão pH = 7,0	Synth	63782
Hexano (PA)	Vetec	0701743
Nitrato de amônio	Nuclear	99060966
Sulfato de magnésio	Synth	67387
Cloreto de sódio	Synth	64510
Fosfato monobásico de potássio	Synth	42664
Agar bacteriológico	Acumedia	101314
Peptona bacteriológica	Oxoid	331734
Àgar Saboreaud	Oxoid	288449

2.2 Amostragem

A amostragem foi constituída por oito cepas de *Aspergillus niger* assim caracterizadas: USP4, USP9, USP9', USP10, USP11, CMMI111, USP336 e USP898 (Bjerk, 2008). A sigla USP refere-se a microrganismos pertencentes à Coleção de fungos da Universidade de São Paulo-USP e foi cedido pelo laboratório de Imunologia de Fungos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A sigla CMMI refere-se a microrganismos pertencentes à Coleção de Microrganismos do departamento de Microbiologia Industrial da Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC. Os fungos acima relacionados foram mantidos em ágar Sabouraud com repiques quinzenais ou mensais conforme a necessidade.

O pó de fumo foi obtido do processamento de tabaco de duas indústrias fumageiras, SC e PM, de Santa Cruz do Sul e o sebo bovino recolhido de frigorífico também do município.

2.3 Seleção de cepa de *Aspergillus niger*

As amostras foram cultivadas em tubos de ensaio inclinados contendo 10 mL de ágar Saboraud (20 g L⁻¹) previamente esterilizados e incubados por sete dias a uma temperatura de 30 °C em estufa bacteriológica. Após, uma alçada de esporos foram coletados e transferidos para tubos de ensaio de 100 x 10 mm contendo 5 mL de ágar lipase (g L⁻¹): ágar bacteriológico 20; peptona 10; Tween 80 10; sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,5; cloreto de sódio 5; água destilada 1 L, não inclinado e incubadas por sete dias para determinação da formação de coluna de precipitação de sabão de cálcio.

2.4 Análise bromatológica do pó de fumo

A análise foi realizada para a determinação dos teores de proteína, cinzas, lipídios e açúcares e umidade em diferentes granulometrias: <9, 9-24, 24-48 e >48 mesh para a amostra SC além das amostras brutas SC e PM.

2.4.1 Determinação de proteínas

Para a determinação de proteínas totais foi utilizado o método de Kjeldhal. Foram pesadas aproximadamente 0,2 g da amostra a ser analisada e 1,5 g da mistura de catalisadores (96% K_2SO_4 , 4% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$), para digestão em tubo Velp para bloco digestor. Foram acrescentados 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. A temperatura do bloco foi mantida a 400°C por 20 minutos. O tubo foi retirado do bloco, e após esfriar, foram acrescentados 5 mL de peróxido de hidrogênio. O bloco foi novamente ligado a mesma temperatura por 15 minutos.

Foram acrescentados 40 mL de água destilada à amostra digerida, para logo após ser transferida para um balão de destilação. Foram dissolvidos 7g de NaOH em 11 mL de água destilada para adicioná-los ao balão. Em um erlenmeyer de 250 mL foram colocados 25 mL de H_3BO_3 2 %, 10 mL de água deionizada e 5 gotas de indicador misto. Este erlenmeyer foi disposto na saída do sistema de destilação. A destilação ocorreu durante aproximadamente 3 horas.

A amostra foi titulada com solução padronizada de HCl 0,1 mol L⁻¹. O fator geral utilizado foi 6,25, para obtenção do resultado em percentual de proteínas.

2.4.2 Determinação de cinzas

Na determinação de cinzas foi utilizado a mufla. Inicialmente os cadinhos foram tarados por uma hora em mufla a 550°C, ocorrendo seu esfriamento no dessecador.

Foram pesados no cadinho aproximadamente 2 g de amostra, levando-a a mufla por 3 horas. O cadinho com as cinzas foi pesado e em seguida colocado novamente a mufla por 1 hora a 550 °C. O cadinho com a amostra foi pesado novamente. Esta última etapa foi repetida até a obtenção de peso constante.

2.4.3 Determinação de lipídios

Para a determinação de lipídios foi utilizado o método de extração em extrator soxhlet. Inicialmente foram tarados os balões de fundo redondo de 500 mL com as pérolas de vidro. Foram pesadas aproximadamente 5 g de amostra, em um cartucho preparado com papel filtro fechado em uma das extremidades, e na outra, fechado com algodão. O solvente utilizado na extração foi o hexano. A extração ocorreu durante 4 horas. Após, os balões foram colocados no rotaevaporador para extração do solvente. Feito isto, os balões foram levados a estufa por uma hora para que todo o solvente fosse retirado. Esta última etapa foi repetida até a obtenção de peso constante.

2.4.4 Determinação de açúcares

Para a determinação de açúcares totais redutores foi utilizado espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm.

Foi preparada uma curva analítica de acordo com a tabela a seguir.

Tabela 7: Curva analítica de determinação de açúcares totais redutores em pó de fumo.

Balão	Solução Estoque* (mL)	Solução de Extração 1:10*** (mL)	mg.mL ⁻¹
Branco	0,0	100	0,0
2	3,0	97,0	0,1250
3	4,5	95,5	0,1875
4	6,0	94,0	0,2500
5	7,5	92,5	0,3125

Foram adicionados 2 mL da solução do balão (2 a 5) em um tubo de ensaio de 30 mL. Ao tubo de ensaio foram adicionados 21 mL de ferricianeto de potássio alcalino. Os tubos foram aquecidos por dez minutos em banho-maria a 95°C, resfriados e submergidos em um recipiente contendo água fria. O espectrofotômetro foi zerado com o branco.

Preparo das soluções:

*Solução Estoque: Foram dissolvidos 0,625g de D(+) glicose PA e 0,625g de D(-) frutose PA em balão volumétrico de 500 mL. O volume foi completado até a marca com solução de extração 1:10.

** Solução de ferricianeto de potássio alcalina (solução de extração): Foram dissolvidos 0,25g de ferricianeto de potássio PA, 12 g de carbonato de sódio anidro PA e 1,2 g de hidróxido de sódio PA em balão volumétrico de 1000 mL. A diluição foi feita até o menisco com água deionizada.

*** Solução de Extração 1:10: Foram diluídos 100 mL da solução de ferricianeto de potássio alcalina em balão volumétrico de 1000 mL, com água deionizada.

2.4.5 Determinação de umidade

A umidade foi determinada por secagem em estufa. As placas de Petri foram colocadas por 1 hora em estufa a 105 °C e após esfriadas em dessecador. Foram pesadas aproximadamente 5g da amostra em placa de Petri e secadas em estufa, com a tampa das placas ao lado, por aproximadamente 5 horas, tampando as placas imediatamente para evitar que absorvessem umidade. Após foram esfriadas em dessecador. A secagem foi feita por uma hora até obter peso constante.

2.5 Produção de lipase em micro escala

O pó de fumo foi peneirado e separado segundo sua granulometria em 3 faixas: 9-24 , 24-48 e > 48 mesh. Para a obtenção de enzimas com atividade lipolítica foram utilizados frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 3 g de pó de fumo, 2 g de sebo bovino e 2 mL de H₂O destilada. Após a esterilização do meio de cultura preparado, os frascos foram inoculados com a suspensão do fungo. Os mesmos foram mantidos à temperatura de 30°C durante um período de 14 dias, e as triplicatas recolhidas em períodos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias, sendo congeladas e armazenadas para posterior análise.

2.6 Ensaio de produção de lipase em macro escala

A amostra de esporos de cultura de *A. niger* USP 898 obtida durante cinco dias de cultivo em ágar Sabouraud a 30°C foram suspensas em 3 litros de água destilada estéril de modo a obter uma concentração de 10^{10} - 10^{12} esporos viáveis por mL (quantificados por *pour plate*).

Alíquotas de 500 mL de suspensão de esporos foram distribuídas em 6 recipientes de 15 litros contendo, cada um deles, 5kg de pó de fumo e 2 kg de sebo bovino previamente autoclavados e bem misturados. Deste material incubado a 28,5 °C – 32 °C (período de 16 janeiro de 2008 a 19 de Março de 2008) foram recolhidos 10 g de cada recipiente no tempo zero e a cada 2 dias por 14 dias e após a cada semana até completar 63 dias, armazenando o material em frascos fechados no freezer.

A atividade lipase de cada frasco foi determinada recolhendo 1 g de amostra de fermentação (pó de fumo + sebo) em 19 mL de solução de Tween 80 a 5% em tampão pH 7,0 0,1 mol L⁻¹ e incubada a 37 °C por 50 min em incubadora orbital. Após retirada da incubadora orbital, a amostra foi mantida em banho de gelo até iniciar a titrimetria de ácidos graxos liberados. A acidez foi determinada por titrimetria potenciométrica com hidróxido de sódio a 0,05 mol L⁻¹ até pH 9. Simultaneamente foi realizado para cada frasco um ensaio em branco adicionando 1 g de amostra de fermentação em 19 mL de substrato imediatamente antes de titular. A unidade de atividade lipolítica (UI) para esta e demais análises especificadas nas seções seguintes, foi considerada como a quantidade em μmol de ácidos graxos liberados pela ação das enzimas contidas em 1g de biomassa durante o tempo de 1 minuto de incubação.

$$UI = \frac{(V_{NaOH}) \cdot (Conc._{NaOH}) \cdot 1 \times 10^{-3} \cdot 1 \times 10^{-6}}{T \cdot (m_{inóculo})} \quad (1)$$

Onde:

UI= Unidade de atividade lipase

V_{NaOH} = volume de NaOH (mL) consumido durante a titulação, sendo calculado pela diferença entre o volume gasto com a amostra e o volume gasto com o branco.

Conc._{NaOH} = concentração (mol L⁻¹) do NaOH utilizado

T = tempo de incubação em minutos

m_{inóculo} = massa do inóculo (g) utilizado

2.7 Determinação do teor residual de sebo bovino

Foi introduzido 1 g de material de fermentação em tubo de ensaio grande e extraído com 3 alíquotas de 10 mL de hexano, agitando por 30 s em agitador de tubos, o material foi coletado com pipeta pasteur contendo algodão na ponta e transferindo o filtrado para um balão previamente tarado. Foram recolhidas três alíquotas no mesmo balão. O solvente foi evaporado em evaporador rotatório e o resíduo de gordura no balão determinado por diferença de massa antes e após a extração e evaporação do solvente.

2.8 Determinação de proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas a partir da utilização do método espectrofotométrico descrito por Lowry et al. (1951). A partir de uma solução de 10 g.L⁻¹ de albumina bovina, foi confeccionada uma curva de diversas concentrações de albumina. Adicionando quantidades previamente calculadas da solução de albumina (entre 0 e 500 µL) e 3,5 mL de solução C (descrita a seguir), a solução ficou em repouso por 15 minutos. Após foi adicionado 1 mL do reagente de Folin a cada balão, completando com água até 5 mL. A absorbância foi medida a λ 660 nm, em triplicata, sendo utilizadas concentrações entre 0 e 10.000 mg L⁻¹. Para o preparo da amostra foi pesado 1g de substrato e adicionados 5 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,0 0,1 mol L⁻¹. Após, a mistura foi levada a um incubador orbital com 150-200 rpm a uma temperatura constante de 37°C por 30 min. Ao final esta foi centrifugada (1600xg, 2 min) e filtrada. O sobrenadante foi usado para determinação de atividade enzimática. Para determinação das proteínas totais, foram retirados 10 µL de amostra, adicionando-a a 3,5 mL da solução C. Ficou em repouso por 15 minutos, logo a seguir foi adicionado 1 mL do reagente de Folin. A absorbância de

cada amostra foi medida a λ 660 nm, em triplicata, correlacionando com os valores de absorbância da curva para determinação da quantidade de proteínas totais.

Solução A: Em balão volumétrico de 250 mL, adicionar 1 g de NaOH, 5 g de Na_2CO_3 e completar com água deionizada.

Solução B: Em balão volumétrico de 100 mL, adicionar 1 g de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), 0,5 g de sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e completar com água deionizada.

Solução C: Em balão volumétrico de 50 mL, adicionar 49 mL da solução A e 1 mL da solução B.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise bromatológica do pó de fumo

Os teores de proteínas, cinzas, açúcares, lipídios e umidade por apresentarem um padrão normalmente encontrado nas análises deste material, indicam que o mesmo pode ser utilizado para a fermentação fúngica em fase sólida.

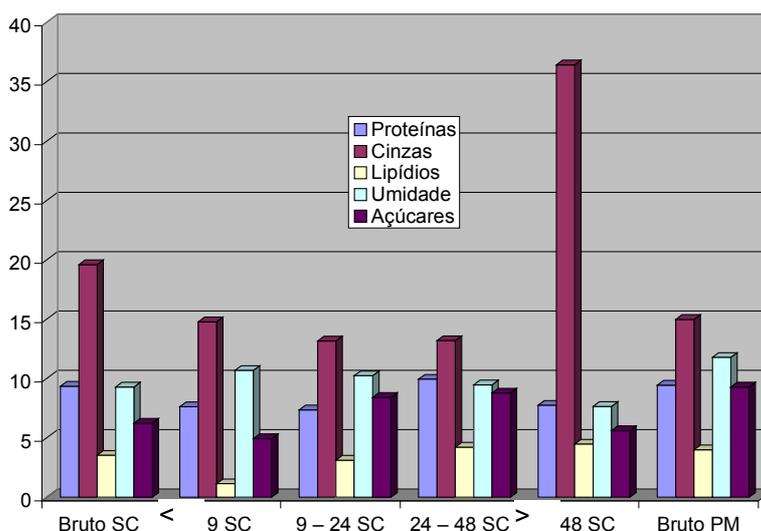


Figura 7: Análise bromatológica de amostras de pó de fumo

Os resultados obtidos na análise bromatológica do pó de fumo estão de acordo com as análises realizadas em outros experimentos com fermentação em pó de fumo (Meher et al., 1994)

Tabela 8: Análise bromatológica (em composição ponderal, %) de amostras de pó de fumo.

	Bruto SC	< 9 SC	9 - 24 SC	24 - 48 SC	> 48 SC	Bruto PM
Proteínas	9,36 ± 0,47	7,62 ± 0,62	7,36 ± 1,23	9,94 ± 1,73	7,75 ± 1,03	9,45 ± 1,34
Cinzas	19,59 ± 2,26	14,78 ± 0,05	13,17 ± 0,05	13,20 ± 0,09	36,42 ± 0,74	14,97 ± 0,16
Lipídios	3,54 ± 0,18	1,14 ± 0,07	3,13 ± 0,18	4,23 ± 0,06	4,48 ± 0,27	3,99 ± 0,17
Umidade	9,30 ± 0,19	10,69 ± 0,20	10,24 ± 0,13	9,46 ± 0,14	7,66 ± 0,13	11,79 ± 0,07
Açúcares	6,24 ± 2,30	4,94 ± 0,46	8,42 ± 1,56	8,78 ± 1,56	5,61 ± 2,19	9,28 ± 1,94

Os resultados obtidos nas diferentes granulometrias descritas acima, na Tabela 8, mostram pequenas diferenças entre si. Quando visualizamos os mesmos resultados na Figura 7 fica fácil perceber uma quantidade maior de cinzas obtidas no material de menor granulometria (>48 SC) e uma quantidade inferior de lipídios na amostra de maior granulometria (<9 SC). Já proteínas, açúcares e umidade demonstram ter um padrão similar em todas as amostras. Isto indica que a utilização do pó de fumo bruto utilizado em nosso experimento não apresenta nenhum risco com relação à possibilidade de ter algum fator negativo para a produção de lipase, que pudesse estar evidenciado quando da comparação com os dados de uma granulometria diferente da utilizada.

3.2 Seleção de cepa de *Aspergillus niger*

As oito cepas formaram halos de precipitação indicando que os microrganismos secretaram lipases para a degradação do Tween 80, adicionado ao meio de cultura como indutor da atividade lipase.

Segundo Shelley et al. (1987), o ágar lipase apresenta característica bastante interessante, pois ele pode ser utilizado para a determinação semi-quantitativa de ácidos graxos liberados pela hidrólise dos ésteres destes ácidos. Quando os ácidos graxos são liberados no meio de cultura, reagem com o cálcio também presente, formando sais de ácidos graxos que são visualizados sob a forma de halos de precipitação brancos na superfície do ágar.

Na figura 8 pode ser visualizado que todas as cepas possuem atividade lipolítica, porém a que se destaca das demais é a cepa (h) de *Aspergillus niger* USP 898. Pois além de ter formado uma grande coluna de precipitação, este é mais turvo do que os demais, indicando maior concentração de sabão de cálcio e, conseqüentemente, maior atividade lipase. Além disto, apresentou reprodutibilidade na triplicata, muito difícil para amostras biológicas.

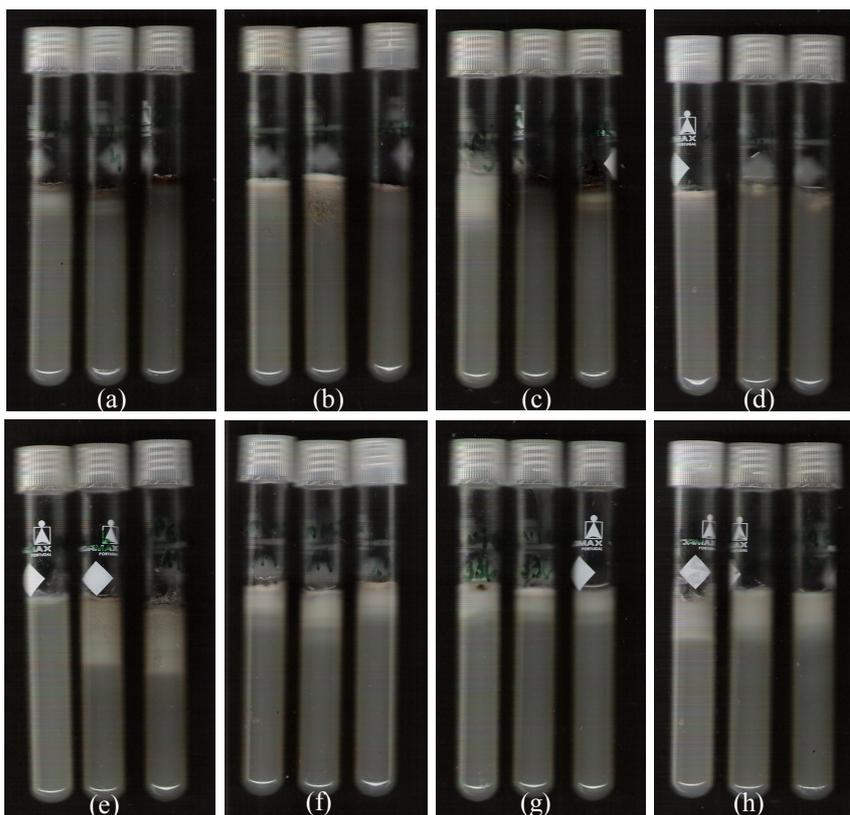


Figura 8 - Avaliação da atividade lipase em coluna das cepas (a) *Aspergillus niger* USP 4, (b) *Aspergillus niger* USP 9, (c) *Aspergillus niger* USP 9', (d) *Aspergillus niger* USP10, (e) *Aspergillus niger* USP11, (f) *Aspergillus niger* CMMI 111, (g) *Aspergillus niger* USP 336, e (h) *Aspergillus niger* USP 898

3.3 Determinação de lipase em micro escala

Com o objetivo de avaliar a melhor granulometria do pó de fumo e o tempo necessário para que houvesse uma maior produção de lipase microbiana foi utilizado no processo de fermentação o fungo *Aspergillus niger* USP898 em micro escala.

A quantidade de ácidos graxos liberados está intimamente relacionada com a quantidade de lipases microbianas responsáveis pela degradação dos respectivos ésteres de ácidos graxos que se encontram presentes no Tween 80 utilizado como substrato.

Os resultados obtidos após a dosagem da atividade lipolítica das amostras cultivadas em fermentação em fase sólida encontram-se na figura 9, a seguir.

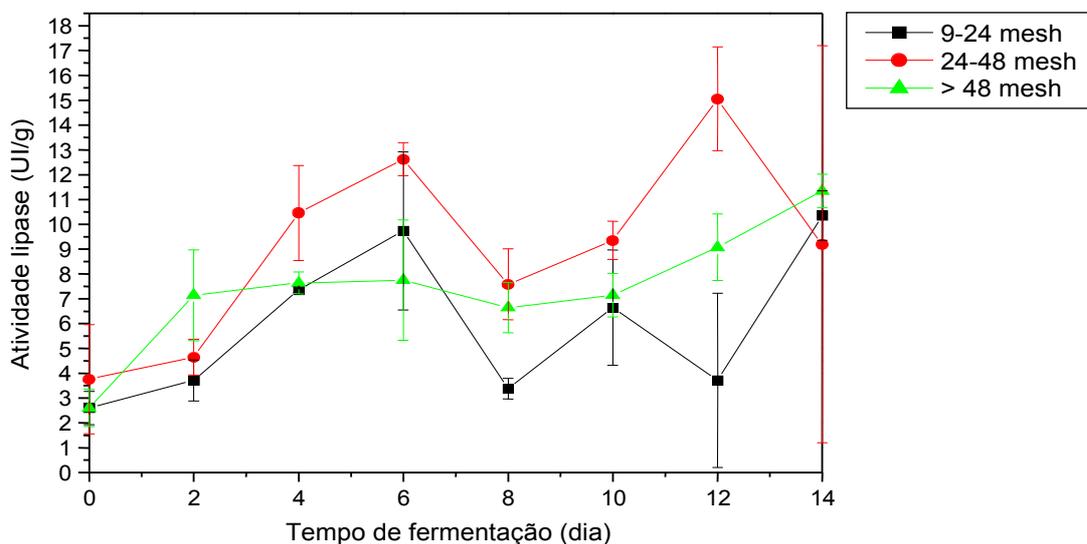


Figura 9 - Gráfico ilustrativo da variância de atividade lipolítica com diferentes granulometrias relacionada ao tempo de incubação.

As curvas obtidas com pó de fumo de granulometria de 9-24 e 24-48 mesh apresentaram semelhança no perfil de produção lipase. Foi possível verificar uma resposta mais rápida quanto à produção de atividade enzimática utilizando pó de fumo com granulometria de 24-48 mesh sendo observados picos de máxima atividade em 6 e 12 dias de fermentação atingindo $12,62 \pm 0,66$ e $15,05 \pm 2,09$ UI/g respectivamente. Já utilizando o pó de fumo com menor granulometria foi possível observar um pico em 2 dias e outro em 14 dias, mas de menor atividade se comparado com os valores atingidos com a condição de granulometria 24-48 mesh. E utilizando uma granulometria menor (> 48 mesh) a variação da curva foi mais homogênea. O pico de produção mais significativo foi aos 14 dias, porém a quantidade de enzima produzida foi inferior aos da curva de 24-48 mesh.

O substrato pó de fumo possui características que aumentam o rendimento do processo. A principal delas é o grau de acessibilidade do microrganismo ao meio (tamanho de partícula). Quanto menor o tamanho maior será a área de contato do microrganismo com o meio, entretanto partículas demasiadamente pequenas podem dificultar a aeração e a dissipação de gases e calor produzidos, prejudicando o rendimento do processo. Desta forma é importante uma granulometria específica para otimizar o processo de fermentação (Doelle et al., 1992). Neste trabalho se percebe que os resultados obtidos estão de acordo com o observado por Doelle e colaboradores. A menor granulometria parece oferecer maior resistência ao fungo devido aos fatores citados anteriormente desfavorecerem um pouco o desenvolvimento do fungo. Quando se compara os dados do de maior tamanho de partícula com os de tamanho intermediário (24 – 48 mesh), as condições de melhor contato, aeração, dissipação dos gases e calor produzidos parecem estar mais adequadas a granulometria 24 – 48 mesh.

3.4 Avaliação quantitativa da atividade lipase em macro escala

Com a determinação da atividade lipolítica, constatou-se que o fungo se adapta bem ao pó de fumo misturado com o sebo bovino, como já constatado por Bjerk (2008). A granulometria característica do pó de fumo utilizada neste experimento, como comentado anteriormente, parece ser um dos fatores que influenciaram na rápida disseminação do fungo sobre este substrato, Figura 10.



Figura 10 – Recipientes com substrato (pó de fumo + sebo bovino) colonizado pelo *A. niger* USP 898.

A curva de dados, demonstrada na Figura 11, mostra uma atividade inicial lenta com picos de produção característicos no quarto, oitavo e quinquagésimo sexto dias.

Após o oitavo dia ocorre uma redução dos valores que é percebido até o décimo segundo dia. A partir daí começa o segundo pico de produção que dura dois dias. Neste momento, décimo quarto dia, inicia novamente uma redução da atividade lipase que se estende até o trigésimo quinto dia. Estas três semanas, que denotam a redução da lipase no substrato, são seguidas por um mesmo período de três semanas onde ocorre um aumento gradativo da atividade lipolítica. A partir do quinquagésimo sexto dia inicia novamente o declínio da atividade lipolítica.

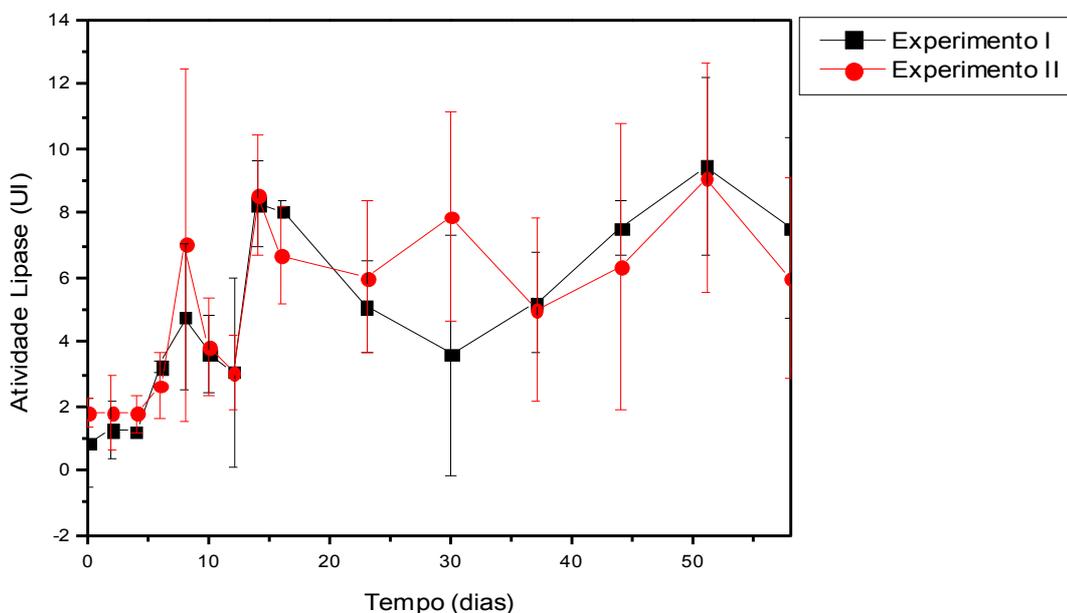


Figura 11 - Perfil de atividade lipase em função do tempo durante fermentação em fase sólida de sistema pó-de-fumo/sebo bovino por *Aspergillus niger* USP 898.

Como observado por Gombert et al. (1999) e Palma et al. (2000), citado por Macagnan (2007), em experimentos realizados para a produção de lipase em FFS, sempre ocorre um máximo na atividade lipase devido ao máximo predomínio de fatores indutivos positivos para a produção de lipase, a partir do qual começam a ser sobrepujados por fatores negativos, tais como início da produção de proteases que

digerem a enzima, bem como a diminuição de substrato indutor ou excesso de ácido graxo livre (retroalimentação negativa), além de alteração do pH do meio. Se compararmos o comportamento da atividade lipolítica de nosso experimento com o gráfico apresentado por Macagnan (2007), vemos um comportamento semelhante, que obedece a lógica descrita anteriormente, como períodos alternados de aumento e decréscimo da produção de lipase.

3.5 Avaliação do teor de gordura residual

A Figura 12 descreve a variação dos teores de gordura, em percentuais, que ocorreu durante a fermentação em fase sólida. Ao analisarmos os resultados obtidos sobre a gordura residual é possível notar uma redução constante dos teores de sebo bovino. Esta tendência é claramente perceptível a partir do momento em que o fungo ocupa de forma homogênea a camada superior do substrato. Durante o período inicial de colonização do fungo se percebe uma variação com relação aos valores residuais de gordura. Isto pode estar relacionado a coleta das amostras em pontos que apresentavam concentrações diferentes do fungo aqui analisado.

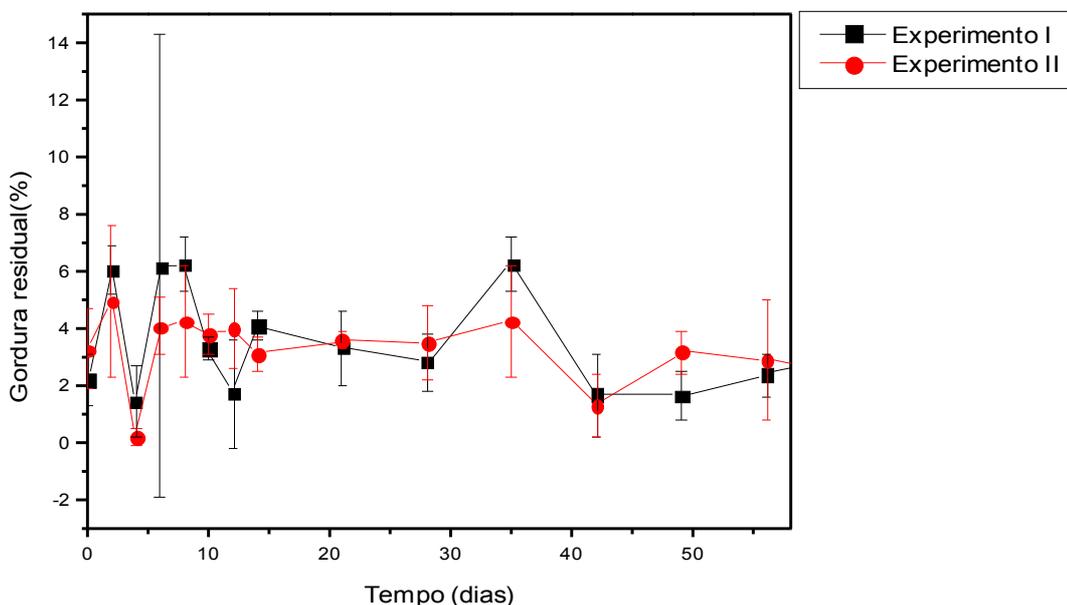


Figura 12 – Percentual de gordura residual em função do tempo durante fermentação em fase sólida de sistema pó-de-fumo/sebo bovino por *Aspergillus niger* USP 898.

3.6 Avaliação do teor de proteína total

Na Figura 13 observa-se a variação do teor de proteína total durante o experimento. Os valores obtidos variam em proporções bem menores do que os teores de gordura. Nos quatorze primeiros dias da SSF é mais fácil observar uma variação, que de acordo com o já comentado anteriormente pode estar relacionado a coleta de amostras em pontos cuja colonização do fungo apresentavam diferença com relação ao tamanho da colônia contida na amostra. A partir do décimo quarto dia a variação desta curva é mais suave, mas parece acompanhar o observado no início, quando diminui a gordura, diminui também o teor de proteína total, quando inicia a produção de lipase os valores iniciam a tendência, novamente, de aumento.

As amostras recolhidas no quadragésimo segundo dia foram perdidas. Por isso, na Figura 13, observa-se uma descontinuidade dos dados referentes a esta amostragem.

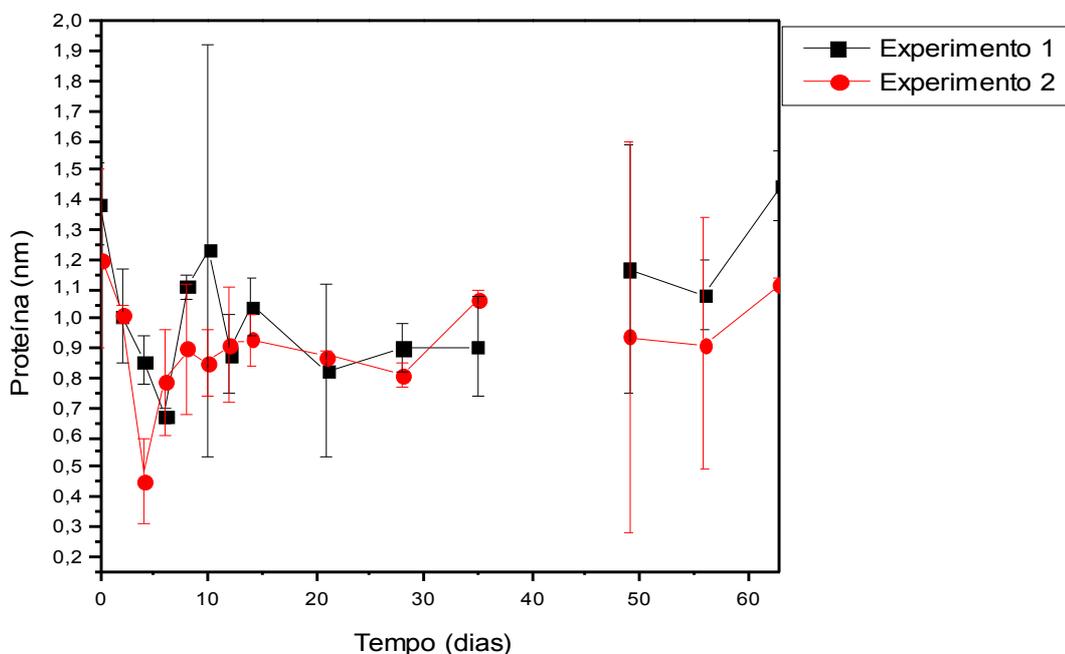


Figura 13 – Teor de Proteína em função do tempo durante fermentação em fase sólida de sistema pó-de-fumo/sebo bovino por *Aspergillus niger* USP 898.

As variações nos resultados obtidas até o décimo quarto dia podem estar relacionados a coleta de amostras em pontos cuja colonização tenha acontecido de forma mais rápida ou mais lenta. Esta pressão de inóculo diferenciada seria a responsável pela obtenção de valores diferentes do esperado. A partir daí os resultados, como o de atividade lipolítica, assumem uma tendência que está de acordo com o observado em outros experimentos, já citados, como o de Gombert et al. (1999) e Palma et al. (2000).

Os desvios padrões observados nos experimentos I e II podem estar relacionados à homogeneização do inóculo com o substrato, a diferenças relacionadas ao crescimento micelial em cada recipiente quando da retirada das amostras, bem como quanto à profundidade do substrato. Mas, independente da

diferença apresentada nestes desvios, o comportamento relativo à produção é o mesmo nos dois ensaios.

Cordova et al. (1997), utilizando bagaço de cana e torta de azeite de oliva como substrato para a SSF de fungos, constatou a importância da gordura vegetal para a produção de lipase. Quando utilizado somente o bagaço de cana, os fungos produziram uma quantidade muito baixa de lipase. Quando a torta de azeite de oliva foi adicionada ao bagaço de cana, a produção de lipase aumentou consideravelmente. Em nossa SSF, podemos perceber, da mesma forma, a importância da gordura animal, sebo bovino, para a produção de lipase. Nos três ciclos de produção de lipase observou-se um consumo constante de gordura até o final do experimento. Gombert et al. (1999), da mesma forma, verificou que os maiores picos de produção de lipase ocorreram quando, ao substrato, foi acrescentado óleo de oliva. Já nos estudos que Mahadik et al. (2002) e Ellaiah et al. (2001) realizaram com *A.niger*, também é constatado que o óleo de oliva é um bom indutor de lipase e Mahadik et al. (2002), utilizando várias fontes de óleos vegetais, demonstrou ser a fonte de carbono de base lipídica importante para a formação de lipase. Sobre esta importância da fonte de carbono ser de fonte lipídica pode-se acrescentar o que Saxena et al. (2002) descreveu em seu experimento com *A. carneus*. Os autores mencionam que o mesmo apresentou boa atividade lipolítica sobre todos os triacilgliceróis utilizados nos vários substratos, mas demonstrou ter preferência por ácidos graxos de cadeia de carbono C 12:0. Isto pode indicar que um dos motivos dos fungos do gênero *Aspergillus* produzirem mais ou menos lipase pode estar relacionado com o tamanho da cadeia de carbono dos ácidos graxos presentes nos triacilgliceróis do sebo.

A grande preocupação de nosso experimento é poder utilizar resíduos orgânicos baratos e que estejam disponíveis em grandes quantidades em nossa região, como é o caso do pó de fumo e sebo bovino. O pó de fumo pode ser adquirido sem custo nas indústrias fumageiras de nosso município. O sebo bovino, por sua vez, pode ser adquirido mediante um preço que varia de R\$0,20 a R\$0,40 por um quilo nos açougues de Santa Cruz do Sul ou por empresas que negociam o

sebo líquido. Em 28 de agosto de 2008 este produto estava custando R\$1,80 o quilo (Aboissa, 2008). Outras fontes de gordura como azeite de oliva e torta de oleaginosas, já citadas em outros trabalhos, são mais caras que a gordura de origem animal utilizada em nosso experimento devido ao custo de transporte. Estes produtos são produzidos em regiões muito distantes de nosso município e, por isso, se tornam caros em relação ao sebo bovino, que é facilmente encontrado no Vale do Taquari e Vale do Rio Pardo. Somado a isto os programas e políticas voltadas para a produção de biodiesel, bem como a pressão de compra sobre as commodities agrícolas, fazem com que os preços das gorduras vegetais tenham seu preço impulsionado para cima. Uma tabela de preços pode ser visualizada no ANEXO A.

CONCLUSÃO

Na avaliação dos resultados se percebe que o fungo selecionado para produção de lipase em fase sólida, utilizando o pó de fumo e o sebo bovino como nutrientes, tem potencial para produção em escala comercial.

A produção de lipase através do *Aspergillus niger* USP 898 demonstrou ser dependente do tempo, como verificado através dos picos característicos de atividade lipolítica intercalados por diferentes intervalos de tempo. A boa adaptação do fungo ao pó de fumo e sebo bovino mostra que ambos podem, perfeitamente, serem utilizados como substrato para a produção de lipase.

Analisando os resultados obtidos na análise bromatológica do pó de fumo, para diferentes granulometrias, é possível constatar que os teores de proteína, açúcares, lipídios, cinzas e umidade são muito semelhantes. Por não haver diferença entre as diferentes granulometrias, no que diz respeito ao aspecto nutricional para o fungo, a utilização do pó de fumo, na forma bruta, torna-se interessante, pois quanto menor a necessidade de manipulação do material menores serão os custos para a produção de lipase.

Quando se analisam as curvas de produção de lipase e do teor de gordura residual, fica evidente a importância da utilização do sebo bovino misturado ao pó de fumo. Os dados analisados mostraram que o sebo bovino foi consumido durante todo o período de condução do experimento para a produção de lipase.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos pelo grupo de trabalho da UNISC, referentes a produção de lipase, têm sido animadores. O presente trabalho faz parte de uma seqüência de experimentos que visam tornar esta produção tecnicamente viável. Por isso, visando dar seqüência ao referido trabalho, pode-se pensar na proposição de novos experimentos tais como:

- Realizar experimento em recipientes com menor profundidade, em formato de bandejas, utilizando uma quantidade maior de substrato para analisar os resultados relativos a produção qualitativa e quantitativa de lipase.
- Realizar ensaio para a recuperação da enzima produzida em SSF.
- Analisar a viabilidade econômica de produção de lipase em SSF com os resíduos pó de fumo e sebo bovino.

REFERÊNCIAS

ABOISSA 2008 – 30 de setembro 2008, Informativo Semanal.

AFUBRA, empregos no setor fumageiro. Disponível na Internet: <http://www.afubra.com.br/principal.php?acao=conteudo&u_id=1&i_id=1&menus_site_id=10>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2008.

AFUBRA, Perfil do produtor de fumo. Disponível na Internet: <<http://www.afubra.com.br>. Acesso em: 4 de março de 2008.

ATLAS ECONÔMICO DO RIO GRANDE DO SUL. Produção média de fumo do Brasil e dos principais estados produtores - 1998 a 2000 e 2001 a 2003. Disponível na Internet: < <http://www.scp.rs.gov.br/atlas/atlas.asp?menu=266> >. Acesso em: 20 de fevereiro de 2008.

BJERK, T.R., Obtenção de lipases fúngicas oriundas de *Aspergillus niger* por fermentação em fase sólida usando resíduos industriais de pó de fumo e sebo bovino. UNISC, Santa Cruz do Sul – RS, Brasil. 2008.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 10, de 13 de abril de 2007. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 17 de abril de 2007. Disponível em: <http://www.puntofocal.gov.ar/notific_otros_miembros/bra243_t.pdf>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2008.

BRASIL. Portaria nº 016, de 19 de janeiro de 1982. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 22 de janeiro de 1982. Ministério da Agricultura. Disponível em: <http://www.pr.gov.br/claspar/pdf/tabacobenef16_82.pdf>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2008.

CASTILHO, LEDA R. et al.; Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations Federal University of Rio de

Janeiro, COPPE/PEQ, CT sala G-115, Ilha do Fundão, 21945-970 Rio de Janeiro/RJ, Brazil, 1999.

CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos. *Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias: Reatores Anaeróbios*. Belo Horizonte: DESA/UFMG, 1997, cap. 02 e 03, p. 23-95.

CHRISTAKOPOULOS et al., Production and characterization of extracellular lipase from *Calvatia gigantea*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1992, 38, 194-197.

CIVILLINI, MARCELLO et al. *Nicotine Decontamination of Tobacco Agro-Industrial Waste and its Degradation by Microorganisms*. University of Udine. *Waste Management & Research* (1997) 15, 349-35.

COLEN, Gecernir. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. 206 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2006.

CORDOVA, J. et al. *Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse*. ORSTOM, Laboratoire de Biotechnologie, B.P. 5045, 34032 Montpellier, France. 1997.

COUTO, SUSANA RODRIGUEZ; SANROMAN, M. ANGELES; *Application of solid-state fermentation to food industry—A review*, Department of Chemical Engineering, Isaac Newton Building, University of Vigo, Lagoas Marcosende, 36310 Vigo, Spain, 2004.

DARTORA , DAYANE FORTES et al. *Isolamento e Seleção de Microrganismos Produtores de Lipases a partir do Soro de Queijo*. Laboratório de Qualidade Agroindustrial - Bolsistas PIBIC/CNPq - CEFET-PR – Unidade de Pato Branco.

Disponível em: http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t165.doc. Acessado em 21 de abril de 2008.

DELLWEG, H. [1987] *Biotechnologie: Grundlagen und Verfahren*, VCH Weinheim. ISBN 3-527-26533-3.

DOELLE, H.W.; MITCHELL, D. A. and ROLZ, C. E. (eds.), *Solid State Fermentation*, Elsevier, London, 1992.

ELLAIAH P., PRABHAKAR T., RAMAKRISHNA B., TALEB A. THAER, ADINARAYANA K.. *Production of lipase by immobilized cells of Aspergillus niger*. Department of Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Biotechnology Division, Andhra University, Visakhapatnam 530 003, India, 2001.

FU X, ZHU X, GAO K, DUAN J. Oil and fat hydrolysis with lipase from *Aspergillus* sp. *Journal of the American Oil Chemists' Society - JAOCS* 1995;72:527–31.

FUKUDA H, KONDO A, NODA H - *Biodiesel fuel production by transesterification of oils.*— *Journal of Biosciences and Bioengineering*, 2001.

GODTFREDSSEN, S.E. MICROBIAL LIPASES. IN: FOGARTY WM, KELLY ET, EDITORS. *Microbial enzymes and biotechnology*. Amsterdam: Elsevier, 1990:255_74.

GOMBERT, ANDREAS K., ANNETTE L. PINTO, LEDA R. CASTILHO, DENISE M.G. FREIRE. *Lipase production by Penicillium restrictum in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate*, 1999.

GULATI R, SAXENA RX, CUPTHA R, YADAV RP, DAVIDSON WS. *Parametric optimization of Aspergillus terreus lipase production and its potential in ester synthesis*. *Process Biochem* 1999; 35:373–8.

HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. I. Lipases from yeasts (Review). *Acta Biotechnol.*, v. 11, p. 159-167, 1991.

JAEGER, K.-E., A. STEINBÜCHEL, D. JENDROSSEK, *Appl. Environ. Microb.* 61 (1995) 3113–3118.

KALTSCHMITT, M.; MERTEN, D.; WEILAND, P. und SCHULTE-SCHULZE BERNDT, A. (2001): Biogas als regenerative Energie – Stand und Perspektiven, VDI-Bericht 1620. Düsseldorf: VDI Verlag.

KAMINI NR, MALA JGS, PUVANAKRISHNAN R. *Lipase production from Aspergillus niger by solid state fermentation using gingelly oil cake*. *Process Biochem* 1998;33:505_ 11.

KAMINI, N.R., J.G.S. MALA AND R. PUVANAKRISHNAN, *Lipase production from Aspergillus niger, by solid-state fermentation using gingelly oil cake*, 1997.

KIEHL, EDMAR JOSÉ; *Fertilizantes Orgânicos*; Piracicaba; Editora Agronômica “Ceres Ltda”, 492p. : il, 1985.

LAKSHMANAN, CM. *Lipase enzyme technology and its potential applications*. Paper presented at ninth National Convention Chemical Engineers and International Symposium on Importance of biotechnology in the coming decades. Visakhapatnam, India, 5–7 June; 1993.

LANDERTSHAMMER, STEPHANIE. Diplomarbeit *Alternative Treibstoffe* Eine Kosten-Wirksamkeits-Analyse für das Dienstleistungsunternehmen Studienrichtung Landwirtschaft / Agrarökonomik Betreuer: O. Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. Walter Schneeberger. 2006, p.42.

LOWRY ET AL., *J. BIOL. CHEM.* 193: 265-275 (1951).

MACRIS JB, KOURENTZI E, HATZINKOLAOU DG. *Studies on localization and regulation of lipase production by Aspergillus niger*. Process Biochem 1996;31:807–12.

MAHADIK, NUTAN D. et al., *Production of acidic lipase by a mutant of Aspergillus niger NCIM 1207 in submerged fermentation*, NCIM, 2002.

MACAGNAN, M. T., *Biorremediação de resíduos sólidos e produção de lipase de Penicillium sp. Utilizando fermentação em fase sólida*. UNISC, programa de pós-graduação em tecnologia ambiental – Mestrado. Santa Cruz do Sul, 2007.

MEHER, K. K. et al. *Biomethanation of Tobacco Waste*. Tata Research Design and Development Center, 1994.

MOCHIZUKI, M., M. HIRANO, Y. KANMURI, K. KUDO, Y. TOKIWA, J. APPL. POLYM. SCI. 55 (1995) 289–296.

NAMBOODIRI VM, HARIDASAN C, CHATTOPADHYAYA R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. Lipids 2000; 35:495_ 502.

OLAMA ZA, EL-SABAENY AH. Lipase production by *Aspergillus niger* under various growth conditions using solid state fermentation. Microbiologia 1993;9:134_ 41.

PABAI F, KERMASHA S, MORIN A. *Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from Pseudomonas putida, Aspergillus niger and Rhizopus oryzae*. World J Microbiol Biotechnol 1995; 11:669_ 77.

PALMA, M. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.84-86, p.1137-1145, 2000

RAO, P.V., K. JAYARAMAN, C.M. LAKSHMANAN, PROCESS BIOCHEM. 28 (1993) 385–389.

RAPP P, BACKHAUS S. *Formation of extra-cellular lipases by filamentous fungi, yeasts and bacteria*. Enzyme Microb Technol 1992;14: 938–43.

RUBIN B, DENNIS E.A.; LIPASES, PART A: BIOTECHNOLOGY, METHODS ENZYMOL 1997, 284.

SAXENA, R.K., W.S. DAVIDSON, ANITA SHEORAN, BHOOPANDER GIRI; *Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from Aspergillus carneus*, 2002.

SCHIMUNECK, G. *Reaproveitamento de extrato de pó de fumo na produção de lipase por Aspergillus sp*. Programa de pós-graduação em tecnologia ambiental – Mestrado – UNISC. Santa Cruz do Sul, 2007.

SHELLEY, A.W.; DEETH, H.C.; MACRAE, I.C. *Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications*. Journal Microbiology Methodology, ,v.6, p. 127-137, 1987.

SILVA, ADEMIR CASTRO E. *Fungos: O inexplorado potencial enzimático da biodiversidade amazônica*. Disponível em: <http://www.geocities.com/biodiversidade2002/fungos.htm>. Acessado a 9 de janeiro de 2008.

SINDIFUMO, Figura Mapa da Região Sul com principais números do setor, dimensão do setor. Disponível na Internet: <<http://www.sindifumo.com.br/>>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2008.

SPRENGER, Humberto Elias. *Tratabilidade anaeróbia dos resíduos da pesca predatória do camarão*. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Ambiental do Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia da Pontifícia

Universidade Católica do Paraná, sob orientação do Prof. Miguel Mansur Aisse. Curitiba, julho de 2005, p. 9-12.

THEISSING, DR. MATTHIAS. *Biogas Einspeisung und Systemintegration in bestehende Gasnetze* FH JOANNEUM Gesellschaft mbH, Wien, 2006. p. 59.

WEILAND, 2001. *Grundlagen der Methangärung – Biologie und Substrate*, VDI Berichte 1620, Biogas als regenerative Energie – Stand und Perspektiven, VDI-Verlag Düsseldorf.

YADAV RP, SAXENA RK, GUPTHA R, YADAV RP, DAVIDSON WS. Lipase production by *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Folia Microbiol* 1998; 43:373–8.

YAMANE, T.; *Enzyme technology for the lipids industry: an engineering over view*. *J Am Oil Chem Soc* 1987; 64(12):1657–62.

ZAKS, A. DOODS, D.R. Biotransformation in the discovery and development of pharmaceuticals. *Curr. Opin. Drug Discovery Develop.*, 1, 290-303. 1998.

ANEXO A – Informativo Semanal www.aboissa.com.br - Ácidos Graxos Brutos

Produtos - R\$/Ton	Mín.	Máx.	ICMS	Posto	Pagto
Ácido graxo bruto de algodão	800,00	1.250,00	12,00 %	CIF-SP	30dd
Ácido graxo bruto de girassol	900,00	1.400,00	12,00 %	CIF-SP	30dd
Ácido graxo bruto de milho	950,00	1.400,00	12,00 %	CIF-SP	30dd
Ácido graxo bruto misto	850,00	1.350,00	12,00 %	CIF-SP	30dd
Ácido graxo bruto de palma	900,00	1.400,00	12,00 %	CIF-SP	30dd
Ácido graxo bruto de soja	1.200,00	1.450,00	12,00 %	CIF-SP	30dd

Gordura recuperada de soja	1.000,00	1.300,00	12,00 %	CIF-SP	28dd
Óleo recuperado de soja	1.300,00	1.800,00	12,00 %	CIF-SP	30dd
Resíduo de margarina	900,00	1.250,00	12,00 %	CIF-SP	30dd

Fonte: ABOISSA – 30 de Setembro 2008.

Notas: 1. Informações extraídas a partir de negócios já realizados

2. Preços e condições atuais sob consulta.

3. Especificações - clicar sobre o produto

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)