

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis

Tatiana Paula Costa

**PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO DO FUNGO FILAMENTOSO ISOLADO A4 PARA
PRODUÇÃO DE LIPASES**

Diamantina

2020

Tatiana Paula Costa

**PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO DO FUNGO FILAMENTOSO ISOLADO A4 PARA
PRODUÇÃO DE LIPASES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. David Lee Nelson
Coorientadora: Prof^a. Dr.^a Nísia A. V. D. Pinto
Coorientadora: Prof^a. Dr.^a Vivian M. Benassi

Diamantina

2020

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C837p

Costa, Tatiana Paula

Padronização do cultivo do fungo filamentosso isolado A4 para produção de lipases / Tatiana Paula Costa , 2020.

77 p. il.

Orientador: David Lee Nelson

Coorientadoras: Nísia A. V. D. Pinto

Vivian M. Benassi

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.

1. Lipases. 2. Fungo filamentosso. 3. Enzima. I. Nelson, David Lee. II. Pinto, Nísia A. V. D. III. Benassi, Vivian Machado. IV. Título. V. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 660.634

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM

Bibliotecária: Viviane Pedrosa – CRB6/2641

TATIANA PAULA COSTA

Padronização do cultivo do fungo filamentosso isolado A4 para produção de lipases

Dissertação apresentada ao MESTRADO EM BIOCOMBUSTÍVEIS, nível de MESTRADO como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA EM BIOCOMBUSTÍVEIS

Data da aprovação: 18/03/2020

Orientador (a): Prof. Dr. David Lee Nelson
Co-orientador (a): Prof.^a Dr.^a Vivian Machado Benassi
Co-orientador (a): Prof.^a Dr.^a Nísia Andrade Villela Dessimoni Pinto



Prof. Dr. DAVID LEE NELSON - UFVJM



Prof.Dr.^a VIVIAN MACHADO BENASSI – UFVJM



Prof.Dr.^a ARLETE BARBOSA DOS REIS - UFVJM



Prof.Dr.^a JULIANA ROCHA DE MEIRA PIRES - IFNMG

DIAMANTINA

Dedico:

Aos meus pais, João Batista Costa e Teresinha da C. S. Costa por todo amor e ensinamentos que me conduziram por um caminho seguro através da educação e do trabalho, por tudo que são e sempre serão para mim.

Aos meus irmãos Maiken, Tarcimara, Talita, Neimar e Luiz Otávio, por tudo vivido, pelo amor e apoio.

Aos meus cunhados Weldes e Ana Angélica pelo carinho. À minha sobrinha Marcella pelas brincadeiras e carinho. Dedico, também aos mais novos membros da família, João Gabriel e Laura, cujo nascimento veio iluminar e alegrar nossas vidas.

Ao meu padrinho Antônio Fernandes (in memorian) e minha avó Maria de Lourdes (in memorian) por todo amor e por me fazerem querer sempre ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por guiar meus passos, por acalmar meu coração, iluminar minha mente e pelas pessoas que conheci nesta caminhada.

Aos meus pais João e Teresinha, pelo amor e apoio, por me ensinarem a lutar e conquistar tudo que almejo, por estarem sempre ao meu lado e por fazerem parte de mais uma etapa da minha vida.

Aos meus irmãos Maiken, Tarcimara, Neimar, Talita e Luiz Otávio pelo amor e amizade e por apoiarem as minhas escolhas.

Aos meus padrinhos Antônio Fernandes (in memorian) e Vanda Martins pelo amor, apoio e orações, por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu orientador Prof. Dr. David Lee Nelson pelo apoio e gentileza de fazer parte da construção deste trabalho.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Nísia A. V. D. Pinto, pela paciência e oportunidade de realização deste trabalho. Também agradeço a agradável convivência no período em que estive no laboratório.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Vivian M. Benassi, por acreditar em mim, pela paciência, dedicação e gentileza de fazer parte da construção deste trabalho, a mesma me proporcionou um conhecimento inigualável.

À todos que fazem parte do Laboratório de Biomassas e Tecnologia do Cerrado da UFVJM, pelo apoio na realização deste trabalho e pelo uso do espaço e equipamentos.

Aos meus amigos do laboratório: Mirian, Paula, Gessica e Mabilli não só pela ajuda com os experimentos, mas também pelos conselhos, conversas e risadas.

À todos os colegas de pós-graduação, com os quais convivi durante a realização deste trabalho, pela amizade e pelos momentos de descontração e alegria.

Aos meus amigos e amigas, pelos vários momentos de descontração. Em especial Débora, pelos bons momentos, pelo apoio, preocupação e disponibilidade sempre que precisei. Vocês estarão sempre em meus agradecimentos.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, pela oportunidade de realização deste trabalho e aos professores do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis pelos valiosos ensinamentos.

À todos que tenham contribuído de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

RESUMO

Enzimas produzidas por fungos filamentosos têm demonstrado amplas aplicações biotecnológicas nos mais diversos segmentos industriais. Para suprimento dessa demanda, há uma crescente busca por novas linhagens de fungos produtores dessas enzimas, levando ao isolamento e seleção a partir dos mais diferentes biomas. Esse trabalho objetivou analisar a temperatura dos fungos filamentosos, selecionar um fungo filamentoso potencialmente capaz de produzir lipase e otimizar a produção da enzima pelo micro-organismo selecionado. Inicialmente foi analisado a temperatura de crescimento de vinte e um fungos filamentosos do laboratório em meio Aveia e meio BDA, a fim de verificar a melhor temperatura de crescimento de cada micro-organismo. Os fungos em meio aveia com maiores taxas de crescimento a diferentes temperaturas foram o 3.8TA, P3, MB2.9, MB2.12, 4.2 e B8, e em meio BDA foram o 3.8TA, P3, M2.3, C421, B8, 4.2 e A4. Os vinte e um fungos foram testados quanto a sua capacidade de produção de lipases em meio contendo Tween® 80, sendo que destes micro-organismos dois (M1.1 e A4) apresentaram halo de atividade lipolítica quando utilizado a solução reveladora, optando-se pelo fungo A4 para prosseguir com o trabalho. Em seguida, o fungo filamentoso A4 foi incubado em quatro meios submersos distintos (Vogel, Adams, Khanna, e SR), à 30 °C, em estufa bacteriológica, de forma estacionária, durante oito dias e retirados a cada vinte e quatro horas, sendo o meio que apresentou uma melhor atividade lipolítica o Khanna (2,32 U.mL⁻¹) após 120 horas de cultivo. Após definir o meio de cultivo submerso, variou-se sua composição, analisando fonte de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, ureia, nitrato de potássio e suas combinações). Para a fonte de nitrogênio o melhor valor de atividade lipolítica obtido foi 2,15 U.mL⁻¹ (ureia + peptona + KNO₃) pelo fungo filamentoso A4. Em seguida, foram analisadas diferentes fontes de sais (sais Vogel, sais CP, sais SR e suas combinações), estabelecendo a suplementação do meio com sais Vogel. Analisou-se, também, o efeito da variação do pH inicial do meio de cultura (pH iniciais 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0), determinando o 4,5 como ideal para crescimento do isolado A4 e produção de lipases. Por fim, analisou-se a influência de diferentes óleos (soja, milho, girassol, dendê e algodão) como fonte de carbono, e o fungo A4 apresentou uma melhor atividade enzimática em meio de cultura suplementado com óleo de algodão (171,36 U.mL⁻¹). Esses resultados demonstram a importância da seleção de fungos filamentosos como recurso biotecnológico, em especial para a produção de enzimas lipolíticas. A otimização resultou em um aumento na produção da enzima, abrindo perspectivas para a otimização do processo de fermentação submersa utilizando processos de baixo custo.

Palavras chave: Lipases; fungo filamentoso; enzima

ABSTRACT

Enzymes produced by filamentous fungi have had extensive biotechnological applications in the most diverse industrial segments. To supply this demand, there is a growing search for new strains of fungi that produce these enzymes, leading to isolation and selection from the most varied biomes. This work sought to determine the ideal temperature for growth of the filamentous fungi, select a filamentous fungus potentially capable of producing lipase and optimize the production of the enzyme by the selected microorganism. Initially, the growth temperatures of 21 filamentous fungi from the laboratory were analyzed in Oat medium and BDA medium to verify the best growth temperature of each microorganism. The fungi in Oat medium with the highest growth rates at different temperatures were 3.8TA, P3, MB2.9, MB2.12, 4.2 and B8, and those with the highest growth rates in BDA medium were 3.8TA, P3, M2.3, C421, B8, 4.2 and A4. The 21 fungi were tested for their ability to produce lipases in medium containing Tween® 80, two of which (M1.1 and A4) presented halos of lipolytic activity when the developing solution was applied. The fungus A4 was chosen for further work. The filamentous fungus A4 was incubated in four different submerged media (Vogel, Adams, Khanna, and SR) at 30 °C in a bacteriological oven, stationary, for eight days. Aliquots were removed every twenty-four hours. The greatest lipolytic activity was observed with the Khanna medium (2.32 U.mL^{-1}) after 120 hours of cultivation. After defining the submerged culture medium, its composition was varied to determine the best nitrogen source (yeast extract, peptone, urea, potassium nitrate and their combinations). For the nitrogen source, the highest lipolytic activity obtained was 2.15 U.mL^{-1} (urea, peptone and KNO_3) with the filamentous fungus A4. Different sources of salts (Vogel salts, CP salts, SR salts and their combinations) were analyzed, and the supplementation of the medium with Vogel salts was established. The effect of the variation of the initial pH of the culture medium (initial pH 4.0; 4.5; 5.0; 5.5 and 6.0) was also determined, and pH 4.5 was ideal for growth of A4 isolate and for lipase production. Finally, the influence of different oils (soy, corn, sunflower, palm and cotton) as a carbon source was determined. The greatest enzymatic activity for the fungus A4 was observed in culture medium supplemented with cotton oil (171.36 U.mL^{-1}). These results demonstrate the importance of selecting filamentous fungi as a biotechnological resource, especially for the production of lipolytic enzymes. The optimization resulted in an increase in the production of the enzyme, which opens perspectives for the optimization of the submerged fermentation process using low cost processes.

Keywords: Lipases; filamentous fungus; enzyme

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Crescimento de uma hifa por alongamento de suas extremidades.....	17
Figura 2 – Características das hifas	17
Figura 3 – Classificação Internacional das Enzimas	22
Figura 4 – Produção de enzimas por fungos filamentosos segundo vários autores	24
Figura 5 – Reações catalisadas por lipases.....	26
Figura 6 – Posicionamento da estrutura secundária que compõe a tampa na ativação da lipase	29
Figura 7 – Mecanismo de ativação interfacial na presença de uma interface hidrofóbica	29
Figura 8 – Mecanismo de catálise enzimática por lipases.....	30
Figura 9 – Reação de transesterificação de uma molécula de triacilglicerol.....	31
Figura 10 – Medição do raio do micélio fúngico em cm.h^{-1}	37
Figura 11 – Medição do raio fúngico e do halo enzimático	38
Figura 12 – Halos formados pela degradação da enzima lipase.....	50
Gráfico 1 – Determinação do meio de cultura e tempo de crescimento do fungo isolado A4 para a produção de lipases	54
Gráfico 2 – Efeito da fonte de nitrogênio na produção de lipases.....	59
Gráfico 3 – Análise da influência de diferentes fontes de sais para a produção lipolítica a partir do fungo isolado A4.....	62
Gráfico 4 – Efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de lipases	63
Gráfico 5 – Análise da ação de diferentes fontes de carbono na produção de lipases pelo fungo isolado A4.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Determinação do local e da amostra onde foram isolados os fungos filamentosos	36
Tabela 2 – Composição em ácidos graxos dos diferentes óleos vegetais.....	31
Tabela 3 – Taxa de crescimento (cm.h^{-1}) dos fungos filamentosos em Meio Aveia, em diferentes temperaturas	47
Tabela 4 – Taxa de crescimento fúngico (cm.h^{-1}) dos fungos filamentosos em Meio BDA, em diferentes temperaturas.....	49
Tabela 5 – Halo de crescimento fúngico (cm) e halo enzimático produzido pelos fungos filamentosos	51
Tabela 6 – Determinação do meio de cultura e tempo de crescimento do fungo isolado A4 para produção de lipases	53
Tabela 7 – Efeito da fonte de nitrogênio na produção de lipases	58
Tabela 8 – Análise da influência de diferentes fontes de sais para a produção lipolítica a partir do fungo isolado A4	51
Tabela 9 – Efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de lipases	63
Tabela 10 – Análise da ação de diferentes fontes de carbono na produção de lipases pelo fungo isolado A4.....	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. REFERÊNCIAL TEÓRICO	16
3.1 Fungos.....	16
3.2 Fungos e Enzimas	21
3.3 Lipases	25
3.4 Aplicações das lipases.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Micro-organismos em estudo.....	35
4.2 Manutenção das cepas em laboratório	36
4.2.1 Meio de cultura sólido Aveia	37
4.3 Análise da temperatura de crescimento dos fungos isolados.....	37
4.4 Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases.....	37
4.6 Contagem dos conídios em câmara de Neubauer	39
4.7 Obtenção da massa micelial e do extrato bruto enzimático	39
4.8 Determinação da atividade enzimática.....	39
4.9 Otimização da produção de lipases pelo fungo isolado A4	40
4.9.1 Análise do meio de cultura e efeito do tempo de cultivo na produção enzimática .	40
4.9.1.1 Meio de cultura Adams	40
4.9.1.2 Meio de cultura Khanna modificado	41
4.9.1.2.1 Solução de sais de Khanna modificado.....	41
4.9.1.3 Meio de cultura Vogel modificado	41
4.9.1.3.1 Solução de sais Vogel modificado.....	41
4.9.1.3.2 Solução de traços de elementos.....	42
4.9.1.4 Meio de cultura SR modificado	42
4.9.1.5 Solução de sais SR Modificado	42

4.9.1.6 Agente emulsificante modificado	42
4.9.1.7 Mistura etanol/cetona.....	42
4.9.1.8 Solução NaOH 0,02 M.....	42
4.9.1.9 Solução de fenolftaleína 2 %	43
4.10 Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio do meio de cultura na produção enzimática.....	43
4.11 Avaliação de diferentes fontes de sais do meio de cultura na produção enzimática	43
4.12 Avaliação do pH ideal do meio de cultura na produção enzimática.....	44
4.13 Avaliação de diferentes fontes de carbono	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Análise do efeito da temperatura de crescimento dos fungos filamentosos isolados.	46
5.2 Triagem de fungos filamentosos produtores de lipases.....	50
5.3 Otimização do meio de cultura para a produção enzimática pelo fungo isolado selecionado e análise do tempo de cultivo.....	53
5.4 Determinação das fontes de nitrogênio do meio de cultura para produção enzimática	56
5.5 Determinação da solução de sais do meio de cultura para crescimento do fungo isolado A4 e produção enzimática.....	60
5.6 Determinação do pH inicial do meio de cultura para a produção enzimática.....	62
5.7 Análise do efeito da fonte de carbono do meio de cultura para a produção lipolítica	64
6. CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos compõem o grupo microbiano com maior número de espécies e são bastante variáveis quanto à morfologia e aos atributos fisiológicos e bioquímicos. Essa diversidade tem propiciado a exploração de algumas linhagens fúngicas, que sob condições adequadas e controladas são capazes de produzir substâncias ou capazes de provocar alterações desejáveis em outras, resultando em produtos ou processos de interesses comerciais. Os fungos têm sido reconhecidos como as melhores fontes de lipases e, ultimamente, várias patentes envolvendo aplicação de lipases fúngicas têm sido requeridas (COLEN, 2006).

Até 2001 eram conhecidas cerca de 4000 enzimas, destas, aproximadamente 200 apresentavam interesse comercial (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Embora alguns biocatalisadores sejam extraídos de tecidos animais e vegetais, a grande maioria das enzimas industriais é obtida de micro-organismos (bactérias e fungos) (BON *et. al.*, 2008).

As enzimas apresentam propriedades importantes que tornam o seu uso como catalisadores bastante desejável, como por exemplo, são muito ativas e versáteis, realizando uma série de transformações de modo seletivo e rápido. A grande vantagem das enzimas, em razão da sua grande especificidade, é que elas catalisam as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas (DZIE-ZAK, 1991; PATEL, 2002; PIZARRO & PARK, 2003).

A produção de enzimas por processos fermentativos submersos utilizando fungos filamentosos tem se destacado, devido à facilidade de cultivo destes micro-organismos, pela alta eficiência na secreção de enzimas para o meio extracelular e, ainda, pela capacidade de utilizarem os resíduos ou coprodutos produzidos pela agroindústria como substrato para crescimento. É interessante ressaltar que, as condições ou os parâmetros dos processos de fermentação, tais como, temperatura, pH, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, micro-organismo utilizado, taxas de aeração e agitação, e outros, são importantes fatores que devem ser avaliados nos processos de produção da enzima.

Dentre as enzimas, as lipases alcançaram um lugar importante no mercado de enzimas, evidenciado pelo aumento do número de publicações na literatura que chega a 1000 por ano. Depois das proteases e amilases, as lipases são consideradas o terceiro grupo de enzimas de maior importância no mercado, provavelmente esse fato está relacionado com a atrativa versatilidade dessas enzimas para aplicações industriais (MACEDO e PASTORE, 1997; HASAN *et. al.*, 2006; RIGO *et. al.*, 2010, e KORMAN *et. al.*, 2013).

Um potencial de aplicação, que vem crescendo e impulsionando pesquisas é a produção de biodiesel e etanol de 2ª geração pelo uso de enzimas como biocatalisadores. Dessa forma, considerando a grande biodiversidade existente, a procura por novas cepas de micro-organismos produtores de enzimas lipolíticas com melhores características fisiológicas em relação à fermentação do substrato, resistência e adaptabilidade à toxicidade de substratos de baixo custo, às condições de temperatura, ao pH e outros, ainda é necessária (NASCIMENTO, 2015).

Assim, o desenvolvimento de estudos de novas linhagens de micro-organismos e fontes de carbono alternativas para fermentação, como os resíduos agroindustriais, pode levar a uma produção de enzimas mais eficaz e com menores custos, além de valorizar e propiciar um destino adequado para o resíduo (NASCIMENTO, 2015).

A otimização das condições de cultivo é de grande importância uma vez que influenciam nas propriedades do micro-organismo produtor da enzima, bem como na razão das lipases retidas no micélio e excretadas para o meio de cultivo (AIRES-BARROS, 1994; CORTEZ, 2016).

Em geral, as lipases são excretadas para o meio de cultivo com o objetivo de captar os nutrientes para a célula microbiana, clivando o substrato lipídico em componentes mais polares e, portanto, mais fáceis de absorção (FROST, 1987; CORTEZ, 2016). Entretanto, a excreção da lipase para o meio de cultivo depende do gênero do fungo filamentososo, como por exemplo, para o *Geotrichum candidum* a lipase é formada na região do envelope celular e retida nesse local por um período, antes de ser liberada (TSUJISAKA, 1973; CORTEZ, 2016).

Dessa forma, esse trabalho objetivou selecionar um fungo potencial produtor de lipase e otimizar a produção da enzima.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar um fungo filamentosso produtor de lipase e otimizar as condições de cultivo do fungo através de fermentação submersa visando o aumento da atividade lipolítica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a temperatura de crescimento dos fungos filamentosos;
- ✓ Avaliar o potencial de vinte e um fungos filamentosos para a produção de lipase em meios de cultura contendo Tween® 80 com substrato para a fermentação das cepas;
- ✓ Selecionar uma cepa fúngica potencialmente produtora da enzima;
- ✓ Determinar o meio de cultura e o tempo de crescimento do fungo isolado A4 para uma maior atividade enzimática;
- ✓ Otimizar as condições de cultivo do processo de fermentação submerso para a produção de lipase, variando-se os parâmetros físico-químico: pH; e nutricionais: concentração de fonte de carbono, fonte de nitrogênio e fonte de sais.

3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1 Fungos

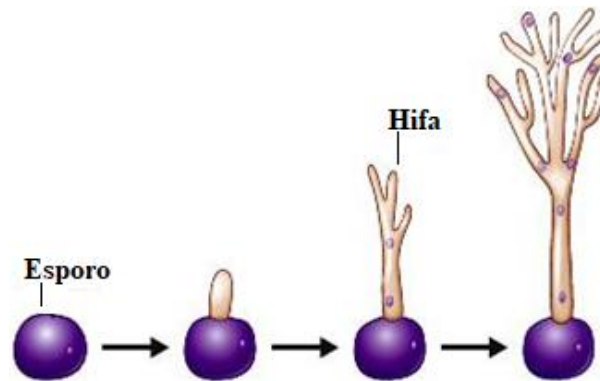
Os fungos são organismos eucariontes, aclorofilados, heterotróficos, considerados biodegradadores naturais (CARLILE; WATKINSON, 1994; GOW; GADD, 1995). Esses micro-organismos obtêm seus nutrientes através da liberação de enzimas para o meio externo, as quais hidrolisam as macromoléculas formando pequenos monômeros, que são absorvidos pelos organismos (LOGUERCIO-LEITE; ESPOSITO, 2004; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Devido a isso, os fungos são encontrados em vários ecossistemas.

Morfologicamente os fungos apresentam-se divididos em dois grandes grupos: fungos leveduriformes e fungos filamentosos (BORZANI *et al.*, 2001; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000). Deacon (2006) acrescentam a existência de um terceiro grupo, dito dimórfico, que pode apresentar-se na forma filamentosa ou leveduriforme dependendo da temperatura a qual é exposto, ou das condições de cultivo.

As leveduras são unicelulares e suas células comumente são esféricas ou ovais, sua reprodução assexuada ocorre por brotamento ou fissão (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000). Em condições especiais, algumas leveduras reproduzem-se mantendo as células conectadas, criando um filamento de células denominado pseudohifa, o conjunto de pseudohifas forma o pseudomicélio (LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006).

Os fungos filamentosos são multicelulares, caracterizam-se pela presença de hifas, que podem ser definidas como um conjunto de células ligadas entre si, sendo o conjunto de hifas denominado de micélio. As hifas fazem parte da estrutura vegetativa desses micro-organismos e atuam diretamente no processo de catabolismo e crescimento, que ocorre por alongamento das extremidades (Figura 1) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; MADIGAN *et al.*, 2016).

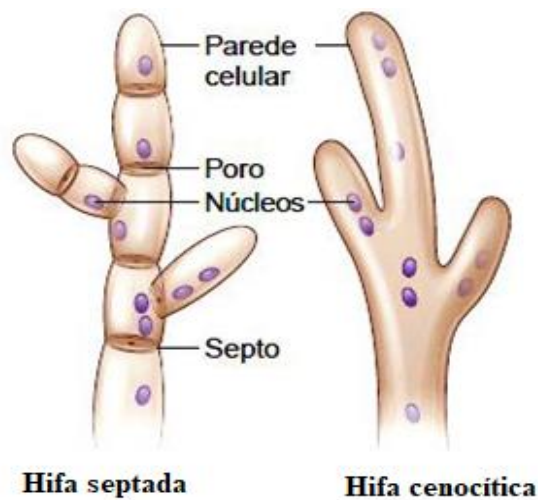
Figura 1 - Crescimento de uma hifa por alongamentos de suas extremidades, partindo de um esporo.



Fonte: Adaptado de Tortora; Funke; Case, (2012).

As hifas em um micélio podem ser vegetativas ou aéreas, as hifas vegetativas têm como função a obtenção de nutrientes, enquanto as hifas aéreas, geralmente, sustentam os esporos reprodutivos, projetando-os acima da superfície (BORZANI *et al.*, 2001; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). As hifas podem apresentar septos, isto é, paredes celulares transversais que dividem a hifa em várias células, estas são denominadas hifas septadas e neste caso, observa-se um ou alguns núcleos por célula. Entretanto, existem hifas onde não há a formação de paredes transversais, estas apresentam vários núcleos e são denominadas hifas cenocíticas (Figura 2) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; MADIGAN *et al.*, 2016).

Figura 2 - Características das hifas dos fungos.



Fonte: Adaptado de Tortora; Funke; Case, 2012.

Os fungos filamentosos podem reproduzir-se pelo crescimento e disseminação de hifas ou pela formação de esporos assexuais e sexuais (MADIGAN *et al.*, 2016). O modo pelo qual os esporos são formados e arranjados constituem um importante fator na identificação dos fungos (BORZANI *et al.*, 2001).

De acordo com Deacon (2006) os fungos são classificados em cinco filos principais: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota*, *Chytridiomycota* e *Glomeromycota*.

O filo *Chytridiomycota* caracteriza-se por conter micro-organismos heterotróficos com parede celular quitinosa e nutrição por absorção. A maioria dos fungos deste filo são pequenos e discretos micro-organismos que crescem como células únicas e simples em ambientes úmidos e aquáticos, sendo considerados colonizadores e degradadores primários de matéria orgânica nestes ambientes (BARR, 1990; ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; DEACON, 2006; PIRES-ZOTTARELLI & GOMES, 2007). Os fungos deste filo possuem significativa importância ambiental, pois a grande maioria de suas espécies permanece de forma microscópica após seu desenvolvimento, sendo estes os primeiros degradadores de matéria orgânica como a celulose e a hemicelulose (SILVA & COELHO, 2006).

Os fungos do filo *Zygomycota* caracterizam-se por possuírem parede celular composta por uma mistura de quitina, quitosana e ácido poliglucurônico; hifas geralmente asseptadas, sendo todo o núcleo contido no interior de um citoplasma comum; produção de esporos de parede grossa, chamados zigosporos, e produção de esporos sexuais por clivagem do citoplasma dentro de um esporângio (DEACON, 2006). Este filo possui a ordem *Mucorales*, que inclui diversas espécies de fungos dos gêneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Phycomyces* e *Thermomucor*, caracterizados por, geralmente, dependerem apenas de fontes simples de carbono para sua sobrevivência (DEACON, 2006).

O filo *Ascomycota* inclui fungos com hifas septadas e algumas espécies de leveduras. Caracterizam-se por possuírem esporos assexuais facilmente espalhados pelo vento, os quais são produzidos a partir do conidióforo. No caso da reprodução sexual, a fusão do núcleo de duas células, que podem ser morfológicamente diferentes ou não, dá origem ao chamado ascósporo – esporo de reprodução sexual dos fungos deste filo, que são produzidos dentro de espécies de “sacos” denominados ascos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Os fungos do filo *Basidiomycota* possuem como característica principal a presença do basídio, onde ocorre a meiose e, subsequente, a produção de esporos sexuais chamados de basidiósporos. As hifas são septadas, com septos do tipo doliporo (DEACON, 2006; TORTORA *et al.*, 2012).

Por fim, o filo *Glomeromycota* é composto por fungos micorrízicos arbusculares distintos de todos os outros grupos de fungos. Estes fungos formam associações simbióticas com grande parte das espécies vegetais, apresentando grande importância econômica e ecológica (SILVA & COELHO, 2006).

Na literatura a outra classificação dos fungos proposta por Hibbett *et al.* (2007) com base em análises da filogenia molecular, ele considera 7 filios: *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Microsporidia*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*. No entanto, não reconhece *Zygomycota*, e ainda o separam em 4 subfilios (*Mucoromycotina*, *Kickxellomycotina*, *Zoopagomycotina* e *Entomophythoromycotina*). Assim, nesta classificação, o reino dos fungos apresenta: 7 filios, 10 subfilios, 35 classes, 12 subclasses e 129 ordens.

No panorama geral da classificação do reino Fungi, apenas oito filios foram reconhecidos por Spatore *et al.* (2018): *Cryptomycota*, *Microsporidia*, *Blastocladiomycota*, *Chytridiomycota*, *Zoopagomycota*, *Mucoromycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Tedersoo *et al.* (2018) propôs uma nova classificação baseada nas filogenias (sequência de genes 18S e 28S) e no tempo de divergência de determinados táxons. Usando esses critérios eles aceitaram 18 filios: *Aphelidiomycota*, *Ascomycota*, *Basidiobolomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Calcarisporiellomycota*, *Caulochytriomycota*, *Chytridiomycota*, *Entomophthoromycota*, *Glomeromycota*, *Kickxellomycota*, *Monoblepharomycota*, *Mortierellomycota*, *Mucoromycota*, *Neocallimastigomycota*, *Olpidiomycota*, *Rozellomycota* e *Zoopagomycota*.

Uma classificação mais recente foi proposta por Wijayawardene *et al.* (2020) com base na sequência de genes 18S, 28S rRNA, RPB1 e RPB2, reconhecendo 19 filios de fungos, estes são: *Aphelidiomycota*, *Ascomycota*, *Basidiobolomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Calcarisporiellomycota*, *Caulochytriomycota*, *Chytridiomycota*, *Entomophthoromycota*, *Entorrhizomycota*, *Glomeromycota*, *Kickxellomycota*, *Monoblepharomycota*, *Mortierellomycota*, *Mucoromycota*, *Neocallimastigomycota*, *Olpidiomycota*, *Rozellomycota* e *Zoopagomycota*.

Os fungos são organismos heterotróficos que obtêm carbono e outros nutrientes da matéria orgânica. Esses nutrientes são adquiridos por absorção, através da liberação de enzimas digestivas no ambiente externo, que atuam hidrolisando moléculas grandes e complexas em moléculas menores e mais solúveis (LOGUERCIO-LEITE; ESPOSITO, 2004; MORTON, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Através do processo de nutrição, esses micro-organismos atuam na ciclagem dos compostos orgânicos, uma vez que decompõem a matéria orgânica morta, tornando os nutri-

entes disponíveis para os próximos organismos da cadeia trófica. São capazes também de metabolizar carboidratos complexos, tais como lignina, que as bactérias não utilizam como nutriente, aumentando sua função de recicladores primários da matéria orgânica em sistemas florestais (LOGUERCIO-LEITE; ESPOSITO, 2004; MORTON, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os fungos são organismos ubíquos, ou seja, estão presente nos mais diversos ambientes, podendo ser saprófitos, parasitas e simbioses, crescendo melhor em pH 5,0. Além do mais, seus esporos que apresentam inúmeros tipos morfológicos, podem dispersar-se por longas distâncias através das correntes de ar, o que aumenta seu caráter de ubiquidade. Com relação ao teor de oxigênio, são essencialmente aeróbicos, existindo algumas leveduras anaeróbicas facultativas. Quanto à pressão osmótica, a maioria é mais resistente quando comparado com as bactérias, podendo crescer em substâncias com baixo grau de umidade e necessitando de menos nitrogênio (MORTON, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A capacidade dos fungos estarem presentes nos mais diversos ambientes deve-se também ao fato de terem se diversificado ao longo do processo evolutivo, para se adaptarem a uma grande variedade de substratos e *habitats*. Isso faz com que diferentes espécies requeiram condições diferentes para um crescimento ótimo (GRIMM *et al.*, 2005).

Com relação à diversidade, os fungos compõem o segundo grupo mais rico em espécies, com estimativas de 1,5 milhões. No entanto, somente 70 mil espécies foram identificadas, o que representa que apenas 5 % do número estimado de fungos estão descritos, e que falta descrever 95 %. Essa afirmação implica que 1,43 milhões de espécies permanecem desconhecidas, contudo, cerca de 1.700 novas espécies são descobertas a cada ano (BLACKWELL, 2011).

De acordo com Bon *et al.* (2008), preferencialmente, o micro-organismo utilizado em um processo de produção enzimática deve apresentar as seguintes características: ser seguro sobre o ponto de vista biológico; apresentar alta capacidade de síntese e excreção da enzima; suportar condições ambientais adversas, relacionados com a pressão osmótica, a temperatura e a força iônica do meio; ser totalmente tolerante à presença de substâncias tóxicas, que podem ser geradas nos processos de tratamento da matéria-prima ou pelo próprio metabolismo celular. Assim como, possuir crescimento rápido, serem cultivados em meio de cultura com composição simples e serem manuseados em condições de cultivo facilmente controladas (TREVISAN, 2004). Vale citar que os fungos crescem onde há fonte de carbono associada a calor e umidade.

Todas estas características somadas à capacidade de sintetizar enzimas com características físico-químicas variadas com alto potencial para aplicações industriais garantiu que nas últimas décadas a utilização de fungos filamentosos em bioprocessos ganhasse muita importância (IWASHITA, 2002; PAPAGIANNI, 2004).

A importância econômica dos fungos está relacionada principalmente à saúde humana e a produção de alimentos. Na indústria farmacêutica muitos produtos são feitos por fungos ou baseados em seus biocompostos. No setor químico esses organismos são importantes produtores de ácidos orgânicos, como ácido cítrico produzido por *Aspergillus niger*. Outros usos incluem a indústria petroquímica com a produção de etanol, a fermentação de óleos e outros produtos vegetais, a indústria de papel e celulose, através da ação enzimática visando à hidrólise de moléculas complexas de celulose e lignina. Nesse contexto, o uso industrial das enzimas obtidas especialmente de *Aspergillus* e *Trichoderma* sp. são os mais diversos, os quais incluem celulasas, lacases, lipases, pectinases, proteases e xilanases (HAWKSWORTH, 2009).

Os fungos filamentosos são potenciais produtores de lipases com propriedades catalíticas únicas, que são muito importantes para várias aplicações comerciais (PANDEY *et al.*, 2016). A maioria dos fungos produtores de lipase comercial e industrialmente importantes pertence aos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor* (RIYADI *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2016; PANDEY *et al.*, 2016; MALDONATO *et al.*, 2016). A produção de lipase por fungo varia de acordo com a cepa e composição do meio de crescimento, como fonte de carbono e nitrogênio e temperatura (PANDEY *et al.*, 2016).

3.2 Fungos e Enzimas

As enzimas são proteínas essenciais ao sistema metabólico de todos os organismos vivos, que podem ser isoladas de animais, plantas e micro-organismos e têm papel importante na degradação da matéria orgânica e na deterioração dos alimentos. Estas proteínas estão envolvidas em atividades naturais como processamento de nutrientes, produção de energia e outras funções metabólicas. Formam-se por cadeias longas de aminoácidos unidas por ligações peptídicas e são biocatalizadores, ou seja, facilitam reações bioquímicas, aumentando a velocidade das reações sem serem consumidas durante o processo (MAHAN; MYERS, 2009).

As enzimas são classificadas e codificadas pelo NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) e divididas

pelas regras oficiais de nomenclatura, em seis grupos de acordo com os compostos sobre os quais agem ou com o tipo de reação que catalisam. Cada um desses grupos é ainda subdividido em classes e subclasses, sendo que, cada enzima é identificada por *EC* (*Enzyme Commission*) seguido de números, de forma que não haja ambiguidade.

Cada enzima possui uma organização estrutural específica, onde o seu sítio ativo permite a ligação de apenas o(s) seu(s) substrato(s), fazendo com que a catálise seja de grande especificidade. A estrutura tridimensional da enzima, ou seja, sua estrutura e seu sítio ativo, podem ser afetados por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças na conformação da proteína, tornando a atividade enzimática dependente das características do meio, “*in vitro*”, principalmente do pH e da temperatura (MARZZOCO; TORRES, 2010). As classes das enzimas recebem o nome pela adição do sufixo “ase” ao nome dos seus substratos (figura 3) ou a uma palavra que descreve sua atividade (NELSON; COX, 2011).

Figura 3 – Classificação Internacional das Enzimas.

Classe de enzimas	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons ou átomos de hidrogênio)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liasas	Adição de grupos a ligações duplas, ou informação de ligações duplas por remoção de grupos
5	Isomerasas	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas á hidrólise de ATP ou cofatores similares

Fonte: Construído a partir de Nelson e Cox (2011).

As enzimas microbianas são consideradas boas fontes para usos industriais em relação à diversidade de outras já encontradas, como as de plantas e animais, sendo que ampla variedade de segmentos industriais utilizam enzimas de origem microbiana para reduzir grandes compostos a unidades fundamentais. De 1998 a 2009, houve um crescimento do mercado de enzimas industriais, sendo 45 % na indústria de alimentos, 34 % na de detergentes, 11 %

na indústria têxtil, 3 % na de couro, 1 % na indústria de papel e celulose (SHARMA *et al.*, 2009).

Sharma *et al.* (2009) afirmam que a utilização de fungos em bioprocessos ganhou importância devido à produção de inúmeras enzimas com características físico-químicas variadas e com excelente potencial para a aplicação industrial. Ressaltam que a capacidade de síntese de enzimas pelos fungos em grande escala, bem como a facilidade com que são excretadas no meio externo, constituem as características fundamentais que justificam o uso desses micro-organismos. Desse modo, os fungos filamentosos representam excelente fonte de produtos biológicos devido à facilidade de manipulação genética, fácil cultivo e ampla diversidade bioquímica, além da elevada produção de enzimas extracelulares (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

O mercado de enzimas industriais foi estimado em mais de 1,6 bilhões de dólares em 2009, com quase metade dessas enzimas produzidas em fermentação por fungos filamentosos. Isso foi possível porque muitas linhagens industrialmente importantes de fungos como *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Acremonium chrysogenum* e *Penicillium chrysogenum*, foram classificados como seguros (GRAS – *Generally Regarded as Safe*) e podem crescer em substratos relativamente baratos, além de produzir e secretar grande quantidade de proteínas recombinantes, ou seja, através de modificações genéticas (SHARMA *et al.*, 2009).

Diversos autores relatam a produção de diferentes enzimas por fungos filamentosos (figura 4). Essas enzimas demonstram relevantes aplicações biotecnológicas nas diversas áreas industriais, como nas indústrias de química fina e produtos biomédicos, além de potencial na biorremediação ambiental.

Figura 4 – Produção de enzimas por fungos filamentosos segundo diversos autores.

Enzima	Fungo pesquisado	Referência
Amilase	<i>Mucor spp.</i> , <i>Rhizopus microsporus</i> , <i>Paecilomyces variotti</i>	Alves <i>et al.</i> (2002), Guimarães <i>et al.</i> (2006)
Celulase	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ahmed <i>et al.</i> (2002)
Lipase	<i>Mucor spp.</i>	Alves <i>et al.</i> (2002)
Pectinase	<i>Rhizopus microsporus</i>	Jayani; Saxena; Gupta (2005), Guimarães <i>et al.</i> (2006)
Protease	<i>Mucor spp.</i>	Alves <i>et al.</i> (2002)
Tanase	<i>Pecinilliun atramentosum</i>	Macedo; Matsuda; Battestin (2005), Belur; Mugeraya (2011), Selwal <i>et al.</i> (2011)
Xilanase	<i>Aspergillus caespitosus</i> , <i>A. phoeni-</i> <i>cis</i>	Guimarães <i>et al.</i> (2006)

Apesar dos avanços biotecnológicos, os programas de seleção primária, ou também chamados *screening*, para metabólitos alvos, a exemplo das enzimas microbianas, são frequentemente utilizados principalmente quando se pretende testar grande quantidade de linhagens microbianas (COLEN; JUNQUEIRA; MORAES-SANTOS, 2006).

Colen, Junqueira e Moraes-Santos (2006) enfatizam que o sucesso ou falha na seleção de micro-organismos produtores de enzimas de interesse, depende de um bom processo de seleção primária. Para os ensaios a serem empregados na fase de seleção primária, deve-se ainda levar em consideração aspectos como simplicidade, custo, rapidez e especificidade do método.

Antes da realização dos procedimentos de seleção primária, os micro-organismos são isolados de amostras ambientais, purificados, selecionados e testados como culturas puras. Essas culturas são submetidas a condições altamente seletivas visando à detecção e seleção daqueles micro-organismos ou metabólitos alvos de interesse (COLEN; JUNQUEIRA; MORAES-SANTOS, 2006).

Para o *screening* utiliza-se primeiramente o meio de cultura sólido em placa de Petri. Esse passo é chamado de seleção primária, onde os micro-organismos que possuem a capacidade de produzir o metabólito ou substância de interesse são detectados. Na próxima etapa, as culturas selecionadas, em geral, são crescidas em cultivo submerso, para se obter o caldo fermentado resultante do crescimento do micro-organismo testado. Por fim, a quantida-

de de metabólitos ou substâncias produzidas é avaliada e comparada com a de outras linhagens alvo, selecionando assim as linhagens mais promissoras (COLEN, 2006).

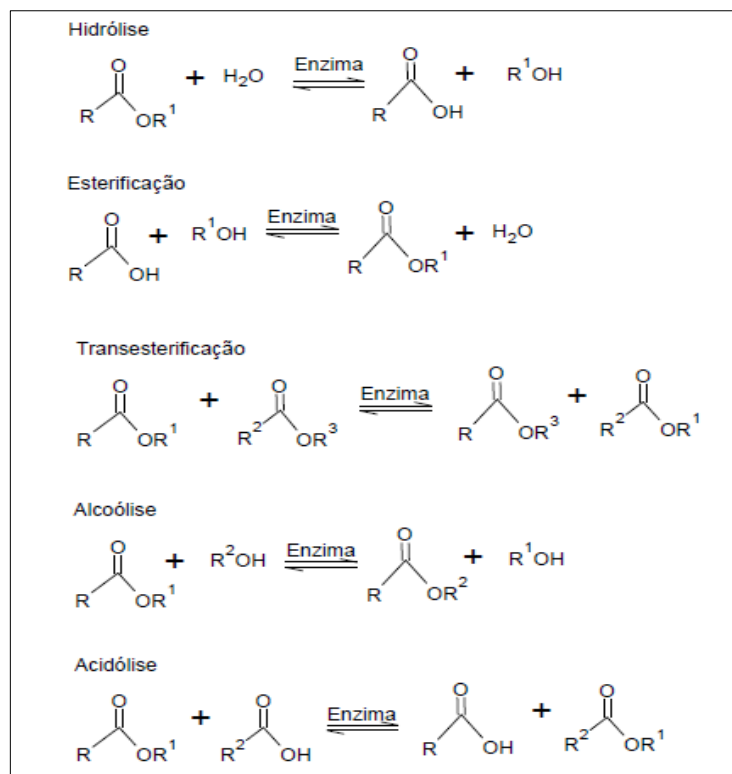
3.3 Lipases

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações ésteres presentes nas moléculas de triacilgliceróis, liberando ácidos graxos livres e glicerol (JAEGER E EGGERT, 2002; DIAZ *et al.*, 2006; COLLA *et. al.*, 2010).

Lipases (triacilglicerol acil hidrolases, EC 3.1.1.3) são serino-hidrolases atuando em uma interface lipídio-água clivando a ligação éster de triacilgliceróis (CONTESINI *et al.*, 2010; LI; ZONG, 2010; MOHAMED *et al.*, 2011; BUENO *et al.*, 2014). Desempenham função importante na natureza, a de metabolizar gorduras, uma das principais fontes de energia para os seres vivos (MEDEIROS *et al.*, 2013).

As lipases catalisam uma série de diferentes reações. Os processos básicos de hidrólise e formação de ésteres (esterificação) podem ser combinados em uma sequência lógica para resultar em reações denominadas interesterificações. Dependendo dos materiais de partida, pode ocorrer uma reação de acidólise, na qual ocorre a transferência do grupamento acila entre um acilglicerol e um ácido carboxílico. Ainda pode ocorrer uma alcoólise, na qual o grupamento acila é transferido entre um acilglicerol e um álcool. Outra reação também possível é a transesterificação, caracterizada pela troca de grupamentos acila entre dois acilgliceróis (Figura 5).

Figura 5 - Reações catalisadas por lipases.



Fonte: Adaptado de Almeida, 2001.

Enzimas lipolíticas podem ser encontradas em animais, plantas e microorganismos, porém, os fungos são as melhores fontes de lipase para aplicações com fins industriais, principalmente para a indústria de alimentos. Isso se deve principalmente ao seu caráter GRAS, devido ao uso histórico de espécies como *Aspergillus* e *Penicillium* na preparação de queijos, alimentos e bebidas, como missô e saqué. Essas enzimas têm sido extensivamente estudadas do ponto de vista genético e bioquímico, o que tem favorecido a geração de várias patentes para aplicação da mesma (COLEN; JUNQUEIRA; MORAES-SANTOS, 2006; DAMASO *et al.*, 2008; TREICHEL *et al.*, 2010). Dependendo da sua origem, as lipases podem apresentar massa molecular variando de 19 a 75 kDa e atuar numa ampla faixa de pH (4,0-9,0) e de temperatura, a qual varia do ambiente até 70 °C (CASTRO, 2004).

A lipase destaca-se entre as enzimas de origem fúngica com grande potencial biotecnológico, com aplicação em diferentes setores industriais, devido à versatilidade da estrutura molecular e das propriedades catalíticas que hidrolisam as gorduras (COLEN, 2006; AZEVEDO *et al.*, 2007; ALBERTON, 2009; SHARMA *et al.*, 2009; RAJESH *et al.*, 2010).

A utilização de lipases em processos industriais apresentam algumas vantagens por serem catalisadores que atuam com grande seletividade e especificidade, não requerem co-fatores, trabalham em ampla faixa de pH, são estáveis em temperaturas elevadas, apresen-

tam propriedades de regioseletivas, quimioseletivas e enantioseletivas, cuja especificidade é controlada pelas propriedades da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação da enzima ao substrato, sendo o triacilglicerídeo seu substrato padrão (DALLAVECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; HASAN *et al.*, 2006; FERNANDES, 2007; HERNANDEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2009; BUSSAMARA *et al.*, 2010). Nesse contexto, a quimioseletividade, a regioseletividade e a enantioseletividade de muitas lipases permitem que essas enzimas catalisem uma ampla variedade de reações orgânicas com mínimo de subprodutos, baixo custo de tratamento operacional e condições brandas de temperatura e pressão. Estas características tornam as lipases altamente aplicáveis em processos industriais (GUPTA, R.; GUPTA, N., RATHI, 2004; VILLENEUVE *et al.* 2000).

Treichel *et al.* (2010) destacam que a importância da lipase pode ser observada pelo elevado número de artigos publicados na última década, bem como, pela demanda industrial por novas fontes dessa enzima com diferentes propriedades catalíticas para atuar em diversos substratos. As melhores espécies produtoras descobertas pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Rhizomucor*.

Existem alguns métodos clássicos para realizar testes qualitativos para *screening* de isolados produtores de lipase em meio sólido. Esses métodos de observação direta baseiam-se na formação de zonas claras ou turvas, em torno das colônias ou na formação de cristais de corantes no interior das gotículas de gorduras na superfície do ágar. Os substratos mais utilizados para a evidência de zonas claras ou turvas são a tributirina, trioleína, Tween 20 e Tween 80. A tributirina é frequentemente utilizada visando à seleção preliminar de linhagens produtoras de lipase, a qual após ser hidrolisada gera dibutirina, monobutirina, glicerol e ácido butírico, todos solúveis em água (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; COLLEN, 2006; RAJESH *et al.*, 2010).

Outro método de *screening* também utilizado é a detecção da atividade da lipase utilizando corante fluorescente, como a rodamina B. Esse corante é emulsionado ao meio de cultura, geralmente contendo óleo de oliva como substrato, no qual é observado halo alaranjado fluorescente ao redor da colônia quando exposta a irradiação por luz UV (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009; MACIEL; PACHECO; GONÇALVES, 2010).

Dentre os métodos utilizados para a determinação quantitativa da produção da lipase estão à fermentação submersa e a fermentação em estado sólido, sendo a última muito similar ao habitat natural dos fungos. Para fermentação submersa pode-se utilizar como substrato, os óleos de soja e de oliva. Para a fermentação em estado sólido pode-se utilizar resí-

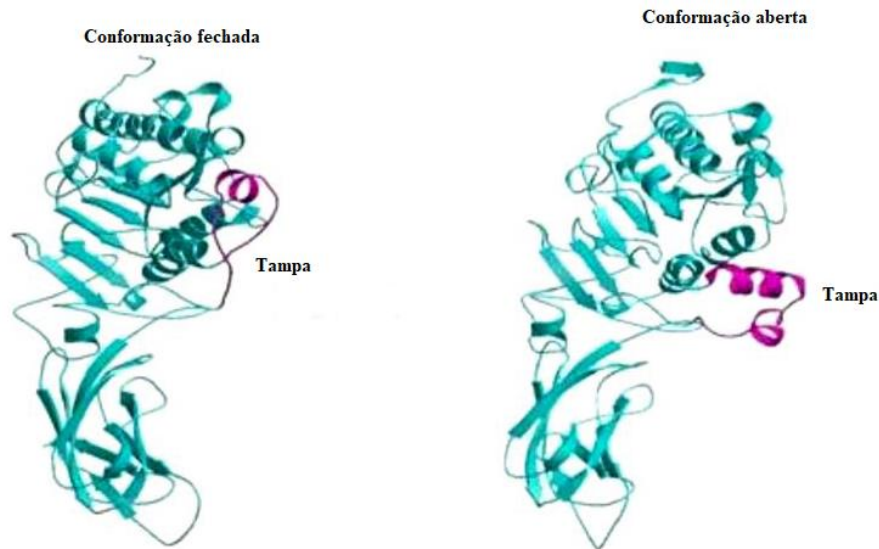
duos agroindustriais como fonte de lipídios sólidos, tais como torta de babaçu e farelo de soja (DAMASO *et al.*, 2008; TREICHEL *et al.*, 2010).

A produção de lipases por micro-organismos como fungos é determinada por variáveis nutricionais e físico-químicas como temperatura, pH, fontes de carbono e nitrogênio e presença de lipídeos, sais inorgânicos, agitação e concentração de oxigênio dissolvido, (SINGH *et al.*, 2012). A metodologia mais empregada para se sintetizar a enzima por microrganismos é a fermentação submersa, sendo que os métodos de fermentação em estado sólido são a segunda opção (SHARMA *et al.*, 2001).

Muitas das propriedades das lipases podem variar de acordo com o gênero e espécie, o que torna difícil o estabelecimento de uma padronização nas metodologias. Como relatado por Castro e colaboradores (2004), conforme a fonte, as lipases podem possuir massa molecular que varia entre 20 e 75 kDa, pH ótimo de atividade numa faixa de 4 a 9 e atuar em uma temperatura de até 70 °C. Contudo, a maioria das lipases microbianas mostram atividade ótima entre pH 7-9 e temperatura ótima entre 30-40 °C (BORNSCHEUER *et al.* 2002).

As lipases são enzimas que apresentam um mecanismo peculiar de atuação, chamado de ativação interfacial (RODRIGUES, 2009), que difere do clássico Michaelis-Menten. A ativação interfacial é explicada pela estrutura tridimensional e o sítio ativo da enzima. O sítio ativo da lipase é caracterizado pela tríade composta de glicina, serina, histidina e ácido glutâmico, também complexos acil-enzima, que se repete em todas as lipases, sendo essa tríade frequentemente protegida na molécula por uma “tampa” hidrofóbica ou “*lid*”, e devido a presença do *lid*, a lipase pode se apresentar em duas conformações, fechada ou aberta conforme figura 6. Em meios aquosos e na ausência de solventes orgânicos e interface, os sítios ativos das lipases apresentam uma conformação fechada e possuem baixa atividade. Por outro lado, no meio reacional, acessível ao substrato, o sítio ativo está aberto expondo a sua zona hidrofóbica e interage com a interface lipídica (JAEGER & REETZ 1998; RODRIGUES, 2009; SALVADOR *et al.*, 2009).

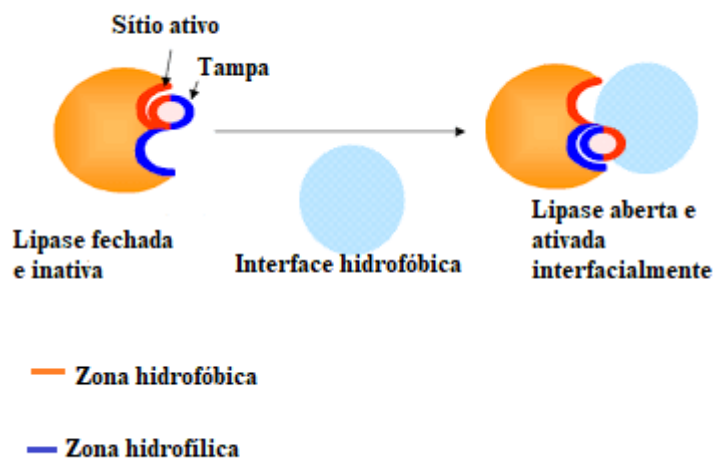
Figura 6 - Posicionamento da estrutura secundária que compõe a tampa na ativação da lipase.



Fonte: Adaptado de Gomide, 2012.

Nas reações enzimáticas, necessariamente deve ocorrer à formação de um intermediário, denominado complexo enzima-substrato para que ocorra a reação, que acontece no sítio ativo das lipases que é coberto por uma cadeia peptídica denominada “tampa”, de característica hidrofóbica (CARVALHO, 2014). Quando a tampa encontra a interface água-lipídeo, ocorre interação no sistema e a “tampa” sofre uma alteração conformacional e o sítio ativo da enzima fica exposto, permitindo a catálise conforme apresentado na figura 7 (MESSIAS *et al.*, 2011).

Figura 7 - Mecanismo de ativação interfacial na presença de uma interface hidrofóbica.



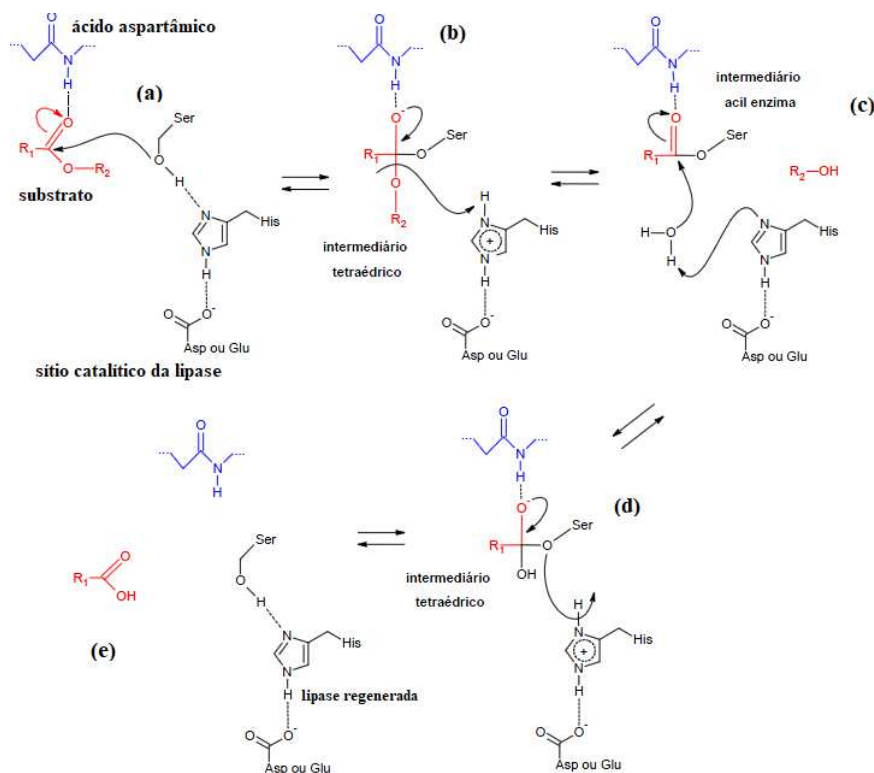
Fonte: Adaptado de Rodrigues, 2009.

Essas enzimas em geral são solúveis, atuam nas interfaces entre as fases aquosas e oleosas e mostram a mais alta atividade, quando a concentração do substrato oleoso é suficiente para formar micelas ou gotas em emulsão (REIS *et al.*, 2009).

A capacidade de ativação interfacial é uma das características mais marcantes das lipases, que possibilita distingui-las das esterases (ERICKSSON *et al.*, 2008).

A Figura 8 representa o mecanismo de hidrólise enzimática, onde a reação envolve a formação de dois intermediários tetraédricos. O mecanismo de ação de lipases se inicia com um ataque do átomo de oxigênio do grupo –OH do resíduo de Ser nucleofílico ao carbono carbonílico ativado do éster lipídico, que está ligado ao sítio ativo da enzima (ALMEIDA, 2012). Este é estabilizado pelos resíduos catalíticos de histidina e ácido aspartâmico e ocorre um rearranjo e uma molécula de álcool é liberada, após ocorre o segundo ataque nucleofílico por um íon hidroxila referente à água. Por fim, há um rearranjo na molécula e o ácido graxo é liberado e em seguida a enzima é regenerada (JAEGER & REETZ, 1998; ALMEIDA, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2011).

Figura 8 - Mecanismo de catálise enzimática por lipases



Fonte: Adaptado de Jaeger & Reetz, 1998.

3.4 Aplicações das lipases

As lipases, como biocatalisadores, apresentam importantes vantagens sobre os catalisadores clássicos industriais. As características de especificidade, regioseletividade e enantioseletividade, permitem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Além disso, os processos enzimáticos evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluente; são mais econômicos; apresentam maior facilidade de manuseio; requerem temperatura e pressão ambientes, condições estas que minimizam a degradação de compostos lábeis (SILVA *et al.*, 2005; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

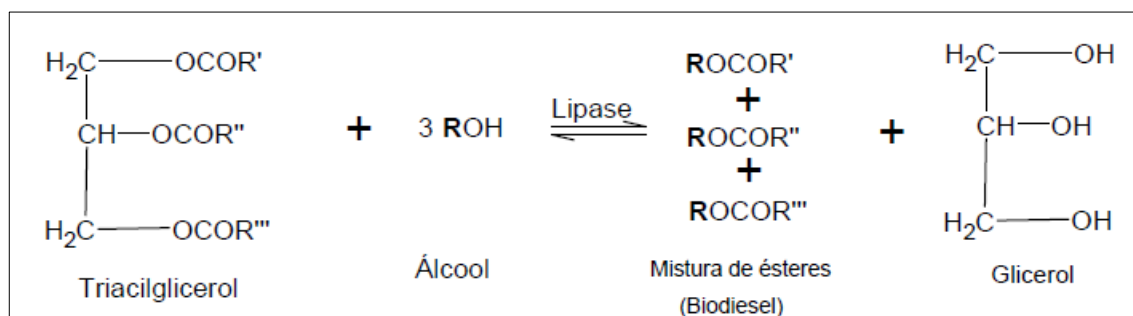
Essa versatilidade das lipases permite que estas enzimas sejam empregadas em diversos setores da indústria na formulação de detergentes, produção de fármacos, cosméticos, alimentos, perfumaria, diagnósticos médicos, síntese de compostos opticamente ativos, produção de aromas e fragrâncias e modificações de óleos e gorduras (SHARMA, 2001), incluindo: a) indústria alimentícia e de bebidas, onde são aplicadas para melhorar o sabor, aroma e aparência dos alimentos, prolongar a conservação e até mesmo reduzir o teor de gorduras; b) indústria química e farmacêutica, onde atuam como catalisadores de reações para a obtenção de compostos e lipídeos específicos, na síntese de surfactantes, além da utilização como auxiliar em medicamentos para dietas; c) indústrias de papelaria e de couros, onde são utilizadas como catalisadores de reações de hidrólise; d) indústria de produtos de limpeza, onde atuam como coadjuvantes em detergentes e agente umidificante (CAVALCANTI *et al.*, 2005; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; VALENTE *et al.*, 2010; MESSIAS *et al.*, 2011; WENZEL *et al.*, 2013).

Uma aplicação das lipases que tem chamado atenção e envolvido grandes esforços em pesquisas é a produção de biocombustíveis. O processo utilizando lipases produz biodiesel diretamente, a partir da transesterificação dos ácidos graxos livres presentes em resíduos oleosos e óleos reciclados. O emprego destas enzimas tem as vantagens de não causar saponificação e corrosão, problemas comuns do processo tradicional catalisado por bases ou ácidos; contribuir para processos mais seguros e ecologicamente corretos; facilitar a separação do subproduto, glicerol; e diminuir o consumo de energia no processo. A principal desvantagem é o custo da enzima. Porém, esta pode ser imobilizada e reciclada para contornar o problema (SANDOVAL *et al.*, 2009; BISEN *et al.*, 2010; PROSKOVÁ *et al.*, 2010)

O biodiesel é um combustível proveniente de uma fonte energética renovável, que é produzido convertendo-se moléculas de triacilglicerol dos óleos vegetais em metil ou etil

éster de cadeia longa, por meio de reações de transesterificação com uso de catalisadores enzimáticos ou químicos como ácidos ou bases (Figura 9) (JAEGER, EGGERT, 2002; ANTCZAK *et al.*, 2009).

Figura 9 - Reação de transesterificação de uma molécula de triacilglicerol e três moléculas de álcool, na presença de um catalisador enzimático formando ésteres de ácidos graxos e glicerol.



Fonte: Adaptado de Robles-Medina *et al.*, 2009.

Os ésteres de ácidos graxos, produtos de reações de transesterificação, são utilizados como matéria-prima em vários tipos de indústrias, na produção de surfactantes não-iônicos, emulsificantes, agentes plastificantes e lubrificantes, aditivos farmacêuticos e cosméticos, óleos comestíveis não-calóricos, aditivos de alimentos ou ainda, podem ser utilizados como uma fonte alternativa de combustível, o biodiesel (SCHUCHARDT *et al.*, 1998).

O biodiesel (alquil ésteres) possui propriedades físico-química e potencial energético semelhante aos do petrodiesel. Pode ser usado em veículos na forma pura ou misturado ao diesel convencional, sem modificações no motor, visto que o biodiesel possui melhores propriedades lubrificantes, que melhora o rendimento do motor e o tempo de vida do mesmo. No Brasil, o biodiesel é usado misturado ao diesel, em 2010, começou-se a usar o B5, ou seja, 5 % de biodiesel é adicionado ao diesel vendido nos postos de combustível de acordo com a Resolução ANP N° 7, de 19/03/2008 (DOU 20.3.2008).

A conversão de óleos e álcoois em ésteres podem ser realizadas por diferentes catalisadores ou em condições supercríticas. Os catalisadores utilizados podem ser classificados como: químico alcalino (hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e metóxido de sódio), químico ácido (ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido clorídrico e ácido sulfônico), enzimático (lipases) e inorgânicos heterogêneos.

Praticamente 100 % da produção mundial de biodiesel é feita por catalisador químico alcalino. No entanto, pequenas quantidades de ácidos graxos livres ou a presença de

água pode levar à formação de sabão causando redução do rendimento. Também existe a necessidade de se tratar os efluentes gerados, pois existe um alto consumo de água nos passos de purificação desse processo. O subproduto formado, o glicerol, apresenta uma alta viscosidade e normalmente se apresenta contaminado com a base, havendo a necessidade de purificação, esses fatores dificultam o processo especialmente no que se refere aos custos. A vantagem desse processo é o baixo custo e o alto rendimento na conversão. Na catálise química por ácidos não ocorre à formação de sabões, mas uma alta temperatura e uma alta razão molar são requeridas. Os catalisadores ácidos raramente são usados em escala industrial por serem mais corrosivos, e apresentam baixo rendimento em relação à catálise básica (SHARMA *et al.*, 2008; ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009).

No entanto, tem se estudado a utilização de enzimas como biocatalisadores. Com a utilização de lipases como catalisadores no processo, vários problemas são eliminados, como a temperatura de reação que é mais branda (30 - 40 °C), representando economia de energia, a conversão dos ésteres é completa, a recuperação do glicerol é simples, não é necessária a purificação de ésteres, é possível a utilização de compostos não-tóxicos, o processo apresenta alta especificidade influenciando da composição do alquil éster produzido, a presença de determinadas quantidades de água é permitida, podem atuar em óleos de diferentes origens inclusive o residual contendo alta taxa de acidez. Além de serem biodegradáveis e não-tóxicos diferentes de alguns catalisadores químicos. Quando se utiliza lipase imobilizada, o biocatalisador pode ser facilmente separado e pode adicionar maior estabilidade à enzima. A lipase pode ser transformada geneticamente alcançando melhor eficiência. Recentemente, lípases termoestáveis e tolerantes a álcool de cadeia curta foram clonadas e utilizadas na síntese de biodiesel (YANG *et al.*, 2009). Esse processo, no entanto, apresenta algumas desvantagens, como menor rendimento quando comparado com o processo sintetizado por catalisador alcalino e também um alto custo em função do preço da enzima (FUKUDA *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2006; HARDING *et al.*, 2007).

A possibilidade de se utilizar enzimas com atividade em elevadas temperaturas, pode aperfeiçoar o processo devido à maior reatividade (maior velocidade de reação, menor restrição de difusão, maior solubilidade do substrato e produtos favorecendo o deslocamento do equilíbrio em reações endotérmicas), ao aumento da solubilidade dos lipídeos e de outros substratos hidrofóbicos em água, a diminuição da viscosidade do substrato, ao aumento da solubilidade dos reagentes, à redução do risco de contaminação por micro-organismos mesofílicos que são a maioria no ambiente. As lipases termoestáveis podem ser também tolerantes a

solventes e detergentes. Essa propriedade está relacionada com a estrutura da enzima e é influenciada por fatores como pH do meio e presença de íons metálicos (TREVISAN, 2004).

Óleos vegetais (soja, milho, algodão, palma, etc) são considerados excelentes fontes de energia renovável e potencialmente inesgotável. São comumente compostos por moléculas de triacilglicerol, sendo bons substratos em reações de transesterificação para a produção do biodiesel (ésteres derivados de ácidos graxos) (SCHUCHARDT *et al.*, 1998; FANGRUI *et al.*, 1999; MEHER *et al.*, 2006). Vários tipos de óleos e gorduras podem ser usados na síntese enzimática de biodiesel, tornando a lipase um catalisador competitivo em relação aos químicos. O uso de óleo residual ou de fritura é um fator relevante na reciclagem desses óleos, que podem ser catalisados por lípases.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biomassas e Tecnologia do Cerrado, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) *campus* Diamantina, Minas Gerais. Esse trabalho foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), número A64AD93.

4.1 Micro-organismos em estudo

Foram analisados vinte e um fungos filamentosos isolados de distintos materiais coletados em diferentes localidades. Os micro-organismos identificados como 4.2 e 4.3 foram isolados de amostras de bagaço de cana-de-açúcar da cidade de Jaíba/MG (SANTOS, 2017). O fungo filamentoso identificado como A4 foi isolado de amostra de solo, na cidade de Diamantina/MG.

Enquanto que o micro-organismo identificado com B8 foi isolado de amostras de palha da folha de coco da cidade de Porteirinha/MG (SILVA, 2017). Os fungos EA138 (NOGUEIRA, 2018) e C333 (CARVALHO E SILVA, 2018) foram isolados de folha em decomposição, já os micro-organismos identificados como C421, C441 e C433 (CARVALHO E SILVA, 2018) foram isolados de fragmento de calça *Jeans* em decomposição, todos isolados a partir de amostras coletadas nas dependências da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, na cidade de Diamantina/MG.

O micro-organismo identificado como L2 foi isolado de amostra de ameixa da cidade de Janaúba/MG (SILVA, 2018). Enquanto que as amostras, MB2.4, MB2.9 e MB2.12 foram isoladas da água e areia do mar do distrito de Regência da Cidade de Linhares/ES (OLIVEIRA, 2019).

Por sua vez, os micro-organismos identificados como M1.1, M1.4 e M1.5 foram isolados de amostras de casca de árvores e os identificados como M2.3 e M2.5 foram isolados de casca de fruto localizadas nas dependências da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, na cidade de Janaúba/MG (SOUZA, 2017).

A amostra identificada como P3 foi isolada da casca de coco úmida coberta de terra, na cidade de Serranópolis de Minas/MG (LOPES, 2017). Por fim, os micro-organismos identificados como 3.5TA e 3.8TA foram isolados do bagaço da cana-de-açúcar na Usina de Álcool e Açúcar São Judas Tadeu-SADA Bio-Energia e Agricultura LTDA, na cidade de Jaíba/MG (ROSA; MARINHO; BENASSI, 2017) (Tabela 1).

Tabela 1 – Determinação do local e da amostra onde foram isolados os fungos filamentosos.

Fungo Filamentoso	Amostra de onde foram isolados	Cidade da Coleta
A 4	Solo	Diamantina/MG
4.2	Bagaço de cana-de-açúcar	Jaíba/MG
4.3	Bagaço de cana-de-açúcar	Jaíba/MG
B8	Palha da folha de coco	Porteirinha/MG
C333	Folha em decomposição	Diamantina/MG
C421	Calça jeans em decomposição	Diamantina/MG
C433	Calça jeans em decomposição	Diamantina/MG
C441	Calça jeans em decomposição	Diamantina/MG
EA138	Folha em decomposição	Diamantina/MG
L2	Ameixa	Janaúba/MG
MB2.4	Água e areia do mar	Linhares/ES
MB2.9	Água e areia do mar	Linhares/ES
MB2.12	Água e areia do mar	Linhares/ES
M1.1	Casca de árvore	Janaúba/MG
M1.4	Casca de árvore	Janaúba/MG
M1.5	Casca de árvore	Janaúba/MG
M2.3	Casca de fruto	Janaúba/MG
M2.5	Casca de fruto	Janaúba/MG
P3	Casca de coco úmida coberta de terra	Serranópolis de Minas/MG
3.5TA	Bagaço de cana-de-açúcar	Jaíba/MG
3.8TA	Bagaço de cana-de-açúcar	Jaíba/MG

4.2 Manutenção das cepas em laboratório

A manutenção da cepa ocorreu através do inóculo dos fungos, utilizando alça de flatina, em meio sólido de aveia Quaker[®] 4 % (m/v) e Ágar 2 % (m/v) (EMERSON, 1941) (item 4.2.1), previamente autoclavados a 120 °C, 1,5 atm, durante 30 minutos. Após o inóculo, os tubos foram mantidos em estufa bacteriológica a 30 °C, e armazenados em geladeira a 4 °C.

As cepas também foram armazenadas em sílica gel Dinâmica[®], segundo a metodologia descrita por Michelin (2009), onde uma suspensão de esporos foi preparada a partir de 2 mL de leite em pó (200 g.L⁻¹ de água destilada autoclavados). Desta suspensão, aproxima-

damente, 1 mL foi adicionado em tubos de ensaio contendo 7 g de sílica gel, previamente autoclavados, e posteriormente agitados. Estes tubos foram lacrados e armazenados a 4 °C.

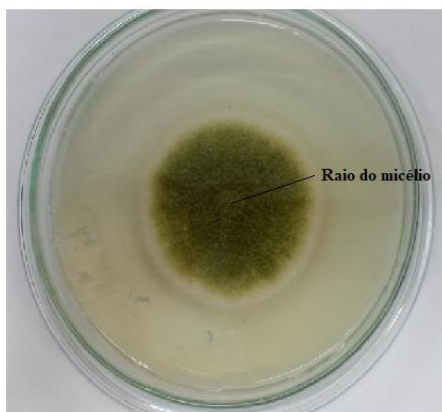
4.2.1 Meio de cultura sólido Aveia

Farinha de Aveia	4 g
Ágar bacteriológico Isofar®	2 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

4.3 Análise da temperatura de crescimento dos fungos isolados

O teste foi realizado através do repique pontual das cepas, utilizando palito de dente autoclavado, em meio de cultura sólido Ágar Sabouraud Isofar® e em meio de cultura sólido Aveia (EMERSON, 1941) (item 4.2.1), com subsequente manutenção em estufa bacteriológica nas seguintes temperaturas: 30, 35, 40, 45 e 50 °C, durante 48 horas. O raio de crescimento dos fungos foi determinado para cada temperatura e a taxa de crescimento foi determinada em cm.h^{-1} (Figura 10).

Figura 10 - Medição do raio do micélio fúngico em cm.h^{-1} .



4.4 Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases

Os vinte e um micro-organismos foram inoculados pontualmente, ao centro da placa de Petri, em meio de cultura sólido contendo Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (20 g.L^{-1}), peptona (10 g.L^{-1}), cloreto de sódio (5 g.L^{-1}), cloreto de cálcio (2 g.L^{-1}), Tween 80 (10 mL.L^{-1}) (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975). As culturas foram mantidos em estufa bacteriológica, a 30 °C, por quatro dias.

Os halos de atividade lipolítica foram revelados pela adição de 2 mL solução reveladora, preparada pela dissolução de 4,0 g de hidróxido de sódio (NaOH) em 10 mL de água destilada. Uma segunda solução foi preparada com a dissolução de 2,0 g de fenolftaleína em 40 mL de etanol. Ambas as soluções foram misturadas e o volume foi completado para 100 mL com água destilada. A solução reveladora (NaOH 0,1 M e fenolftaleína 2 %) foi armazenada em vidro âmbar à temperatura ambiente.

Os halos de atividade de lipase foram identificados pela formação de uma zona clara ao redor da colônia rosa do meio. O raio fúngico e o halo de atividade enzimática (Figura 11) foram medidos com o auxílio de uma régua milimetrada, e utilizados para expressar o crescimento fúngico e a produção de lipase, respectivamente.

Figura 11 - Medição do raio fúngico e do halo enzimático.



4.5 Inóculo

Para a realização do inóculo, a cultura do fungo selecionado foi suspensa em 10 mL de água destilada esterilizada a 120 °C, 1,5 atm, durante 30 minutos, e um volume de 1 mL da suspensão de esporos foi inoculado em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultura submerso, previamente esterilizado.

4.6 Contagem dos conídios em câmara de Neubauer

Para garantir uma quantidade aproximada de esporos em todos os experimentos, fez-se a contagem dos conídios antes de inocular o meio submerso. Utilizou-se 10 µL da solução de esporos utilizado no inóculo do meio, sendo inserido em Câmara de Neubauer, onde obteve, em média, uma solução com $2,5 \times 10^7$ esporos.mL⁻¹.

4.7 Obtenção da massa micelial e do extrato bruto enzimático

A massa micelial foi obtida após separação do micélio do meio de cultura submerso através da filtração à vácuo, com auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro. A massa micelial foi lavada, seca, em temperatura ambiente, e pesada em balança analítica, para analisar o crescimento fúngico nas diferentes condições testadas. Os filtrados contendo as enzimas extracelulares foram armazenados em tubos falcons e, posteriormente, submetidos à medição de volume (mL), pH e a determinação da atividade enzimática.

4.8 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática sobre um substrato natural das lipases, o Azeite de Oliva ABC®, foi quantificada por titulometria.

Para a medida da atividade lipolítica foi usado um substrato preparado com 70 mL de agente emulsificante e 30 mL de Azeite de Oliva ABC® (Lote: 1712358) homogeneizados em agitador magnético. As reações foram realizadas em tubos Falcon® de 15 mL contendo: 3 mL de substrato e 3 mL de extrato enzimático bruto. Os tubos contendo apenas os substratos foram inseridos em banho-maria a 40 °C durante 5 minutos. Adicionou-se o extrato bruto enzimático, sendo retiradas amostras de 1 mL da mistura da reação de cada tubo nos tempos 0 e 15 minutos e, posteriormente, vertidas em 1 mL de solução de acetona:etanol (1:1), para interromper a reação. Os ácidos graxos produzidos foram titulados com solução aquosa padrão de NaOH 0,02 M usando-se como indicador 2 gotas de solução de fenolftaleína 2 %.

Uma unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um µmol de ácido graxo por minuto. Após a titulação das amostras, as atividades lipolíticas foram calculadas segundo a seguinte equação (BARON, 2008):

$$A = \frac{\Delta V \times [\text{NaOH}] \times \text{FC}}{t \times V} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

A = Atividade enzimática (U.mL⁻¹);

ΔV: NaOH consumido na titulação, em mL;

[NaOH]: concentração de NaOH em μmol.mL⁻¹;

FC: fator de correção do NaOH;

t: tempo de reação em minutos (min);

V: volume da solução enzimática (mL);

4.9 Otimização da produção de lipases pelo fungo isolado A4

4.9.1 Análise do meio de cultura e efeito do tempo de cultivo na produção enzimática

Foram testados os meios submersos Adams (ADAMS, 1990), Khanna com modificações na sua solução de sais pela retirada do sal NH₄NO₃ (KHANNA; SUNDARI; KUMAR, 1995), Vogel com modificação na sua solução de sais retirando os compostos NH₄NO₃ e Na₂MoO₄. H₂O, e a solução de biotina (VOGEL, 1964) e SR também sendo retirado da sua solução de sais o composto NH₄H₂PO₄ (RIZZATTI *et al.*, 2001).

Prepararam-se 25 mL de meio de cultura, contidos em Erlenmeyer de 125 mL, e após autoclavagem a 120 °C, 1,5 atm durante 30 minutos realizou-se o inóculo do fungo selecionado (item). O fungo foi cultivado durante oito dias a 30 °C, sendo analisado o crescimento e a atividade enzimática referente a 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas de cultivo, para a determinação do melhor dia de crescimento. Decorrido o tempo de incubação, os meios foram filtrados separando a massa micelial do extrato bruto extracelular contendo as enzimas.

4.9.1.1 Meio de cultura Adams

Peptona	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,05 g
Azeite de oliva ABC [®]	1 mL
Água deionizada q.s.p.	100 mL

4.9.1.2 Meio de cultura Khanna modificado

Solução de sais de Khanna modificado	5 mL
Extrato de levedura	0,1 g
Azeite de oliva ABC®	1 mL
Água deionizada q.s.p	100 mL

4.9.1.2.1 Solução de sais de Khanna modificado

KH_2PO_4	1,3 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,362 g
KCl	0,098 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,007 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0138 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,0066 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,0062 g
Água deionizada q.s.p	100 mL

4.9.1.3 Meio de cultura Vogel modificado

Solução de sais de Vogel	2,0 mL
Extrato de levedura	0,75 g
Peptona	0,75 g
Azeite de oliva ABC®	1 mL
Água deionizada q.s.p	100 mL

4.9.1.3.1 Solução de sais Vogel modificado

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	150,0 g
KH_2PO_4	250,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10,0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	5,0 g
Solução de traços de elementos	5,0 mL
Clorofórmio	2,0 mL
Água deionizada q.s.p	1000 mL

4.9.1.3.2 Solução de traços de elementos

$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	5,0 g
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	5,0 g
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$	1,0 g
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0,25 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05 g
H_3BO_3	0,05 g
Clorofórmio	0,2 mL
Água deionizada q.s.p	100 mL

4.9.1.4 Meio de cultura SR modificado

Solução de sais SR	5,0 mL
Extrato de levedura	0,45 g
Peptona	0,02 g
Azeite de oliva ABC®	1 mL
Água deionizada q.s.p	100 mL

4.9.1.5 Solução de sais SR Modificado

$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,24 g
KH_2PO_4	0,3 g
Água deionizada q.s.p	100 mL

4.9.1.6 Agente emulsificante modificado

Tween 80 Sigma®	1 mL
Tampão Acetato de sódio pH 5,5	99 mL

*A modificação consistiu na substituição do tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 7,0 do meio de cultivo original pelo tampão acetato de sódio pH 5,5.

4.9.1.7 Mistura etanol/cetona

Acetona Proquímios®	50 mL
Etanol absoluto	50 mL

4.9.1.8 Solução NaOH 0,02 M

Hidróxido de sódio Vetec®	0,8 g
---------------------------	-------

Água destilada q.s.p	1000 mL
----------------------	---------

4.9.1.9 Solução de fenolftaleína 2 %

Fenolftaleína Neon®	2,0 g
Etanol absoluto	40 mL
Água destilada q.s.p	100 mL

4.10 Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio do meio de cultura na produção enzimática

A influência da fonte de nitrogênio para a produção de lipases foi avaliada, sendo substituída a fonte de nitrogênio original do meio Khanna com modificação – extrato de levedura 0,1 % – por peptona, KNO₃, ureia, extrato de levedura e suas respectivas combinações. A combinação entre as fontes de nitrogênio resultou em diferentes concentrações, sendo de 0,05 % para cada reagente, quando utilizou-se peptona e extrato de levedura; ureia e extrato de levedura; peptona e ureia; nitrato de potássio e extrato de levedura; nitrato de potássio e peptona; nitrato de potássio e ureia. Na combinação de três fontes de nitrogênio resultou numa concentração de 0,0333 % para cada fonte utilizada, sendo as combinações ureia, peptona e extrato de levedura; ureia, peptona e nitrato de potássio; ureia, extrato de levedura e nitrato de potássio; peptona, extrato de levedura e nitrato de potássio. Quando combinou-se as quatro fontes de nitrogênio (peptona, extrato de levedura, ureia e nitrato de potássio) resultou numa concentração de 0,025 % de cada fonte utilizada.

O controle foi o meio original com extrato de levedura e o meio original sem a fonte de nitrogênio. As cepas inoculadas foram incubadas em estufa bacteriológica, à 30 °C, durante cinco dias. Decorrido o tempo de incubação, os meios foram filtrados separando a massa micelial do extrato bruto extracelular contendo as enzimas.

4.11 Avaliação de diferentes fontes de sais do meio de cultura na produção enzimática

Após escolher a fonte de nitrogênio, o fungo foi cultivado no meio Khanna modificado, variando a fonte de sais, sendo essas: solução de sais SR, solução de sais CP, solução de sais Vogel, sem adição de sais e variando a combinação entre essas soluções de sais, sendo mantidos em estufa bacteriológica, a 30 °C, por cinco dias. Decorrido o tempo de incubação,

os meios foram filtrados separando a massa micelial do extrato bruto extracelular contendo as enzimas.

4.12 Avaliação do pH ideal do meio de cultura na produção enzimática

O pH ideal do meio de cultura Khanna modificado acrescido de solução de sais Vogel com ureia, peptona e KNO_3 como fonte de nitrogênio e Azeite de Oliva ABC® como fonte de carbono foi analisado a fim de se determinar o pH adequado para a produção enzimática.

Para isso, preparou-se o meio de cultura variando o pH de 4,0 a 6,0, com intervalos de 0,5. Os meios de culturas foram incubados em estufa bacteriológica, a 30 °C, durante cinco dias. Decorrido o tempo de incubação, os meios foram filtrados separando a massa micelial do extrato bruto extracelular contendo as enzimas.

4.13 Avaliação de diferentes fontes de carbono

Analisou-se a influência de distintas fontes de carbono, todos na concentração de 1 % (m/v) na produção enzimática. O fungo foi cultivado em meio submerso Khanna modificado com adição dos sais Vogel, peptona, ureia e KNO_3 como fonte de nitrogênio, pH inicial do meio 4,5, sendo as fontes de carbono analisadas: óleo de canola, óleo de dendê, óleo de soja, óleo de milho, óleo de girassol e óleo de algodão. As composições dos óleos vegetais são apresentadas na Tabela 2.

O controle foi o meio contendo azeite de oliva ABC® como fonte de carbono. O crescimento ocorreu em estufa bacteriológica, de forma estacionária, a 30 °C, por cinco dias. Decorrido o tempo de incubação, os meios foram filtrados separando a massa micelial do extrato bruto extracelular contendo as enzimas.

Tabela 2. Composição em ácidos graxos dos diferentes óleos vegetais

Ácido graxo (% massa)	Óleo vegetal						
	Azeite	Canola	Milho	Soja	Dendê	Girassol	Algodão
Esteárico – C18:0	2,5	1,1-2,5	2,5	3,0-5,4	3,5-6,5	1,0-10,0	2,1-3,3
Láurico – C12:0	-	-	-	0,1	-	-	-
Linoleico – C18:2	7,1	16,0-25,0	52,1	49,8-57,1	6,5-15,0	55,0-75,0	46,7-58,2
Linolênico – C18:3	0,6	17,4	1,0	5,5-9,5	-	-	-
Oleico – C18:1	78,1	52,0-67,0	30,5	17,7-28,5	36,0-47,0	14,0-35,0	14,7-21,7
Palmítico – C16:0	10,2	3,3-6,0	13,0	9,7-13,3	35,0-47,0	1,0	21,4-26,4

Fonte: GUNSTONE, F., 2008; O'BRIEN, R., 2009; RAMOS et. al. 2011; NUNES, 2013; CARVALHO, 2017.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do efeito da temperatura de crescimento dos fungos filamentosos isolados

Dos vinte e um micro-organismos isolados, oito fungos identificados como C333, C433, C441, EA138, L2, MB2.9, M1.4 e M1.5 cresceram, preferencialmente, quando incubados à 30 °C, apresentando taxa de crescimento de 0,007 cm.h⁻¹, 0,005 cm.h⁻¹, 0,007 cm.h⁻¹, 0,022 cm.h⁻¹, 0,007 cm.h⁻¹, 0,034 cm.h⁻¹, 0,008 cm.h⁻¹ e 0,026 cm.h⁻¹, respectivamente. Contudo, também apresentaram crescimento na temperatura de 35 °C, com exceção dos fungos C441, 433 e EA138, os quais não cresceram em nenhuma outra temperatura (Tabela 3).

Por sua vez, os fungos filamentosos A4, 4.2, 4.3, C421, MB2.12, MB2.4, M1.1, M2.3, M2.5, P3, 3.5TA e 3.8TA apresentaram melhor crescimento quando incubados à 35 °C, o valor obtido para as taxas de crescimento foram de 0,027 cm.h⁻¹, 0,076 cm.h⁻¹, 0,023 cm.h⁻¹, 0,021 cm.h⁻¹, 0,059 cm.h⁻¹, 0,021 cm.h⁻¹, 0,023 cm.h⁻¹, 0,019 cm.h⁻¹, 0,020 cm.h⁻¹, 0,073 cm.h⁻¹, 0,016 cm.h⁻¹ e 0,090 cm.h⁻¹, respectivamente (Tabela 3).

Desses micro-organismos, sete fungos identificados como A4, 4.2, 4.3, C421, MB2.4, 3.5TA e 3.8TA toleraram a temperatura de 40 °C, sendo que o fungo isolado 4.2 apresentou a maior taxa de crescimento, 0,068 cm.h⁻¹, a esta temperatura quando comparado com os demais micro-organismos (Tabela 3).

O fungo isolado B8 destacou-se com as maiores taxas de crescimento durante a elevação da temperatura, obtendo 0,069 cm.h⁻¹ à 30 °C, 0,071 cm.h⁻¹ à 35 °C e 0,084 cm.h⁻¹ à 40 °C, (Tabela 3). Essa capacidade que alguns micro-organismos apresentam de tolerar altas temperaturas é de grande importância industrial, pois a maioria dos processos enzimáticos ocorre em altas temperaturas.

Tabela 3 - Taxa de crescimento (cm.h^{-1}) dos fungos filamentosos em Meio Aveia, em diferentes temperaturas.

Fungos	Temperaturas de Crescimento (cm.h^{-1})			
	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C
A4	0,022 ± 0,01 b	0,027 ± 0,02 b	0,012 ± 0,01 b	- b
4.2	0,054 ± 0,01 a	0,076 ± 0,01 a	0,068 ± 0,01 a	- b
4.3	0,021 ± 0,01 b	0,023 ± 0,01 b	0,011 ± 0,01 b	- b
B8	0,069 ± 0,03 a	0,071 ± 0,01 a	0,084 ± 0,01 a	- b
C333	0,007 ± 0,01 c	0,005 ± 0,01 c	- d	- b
C421	0,014 ± 0,02 b	0,021 ± 0,01 b	0,015 ± 0,01 b	- b
C433	0,005 ± 0,03 c	- d	- d	- b
C441	0,007 ± 0,03 c	- d	- d	- b
EA138	0,022 ± 0,01 b	- d	- d	- b
L2	0,007 ± 0,02 c	0,005 ± 0,01 c	- d	- b
MB2.4	0,010 ± 0,02 c	0,021 ± 0,01 b	0,009 ± 0,03 d	- b
MB2.9	0,034 ± 0,01 b	0,019 ± 0,01 b	- d	- b
MB2.12	0,043 ± 0,01 a	0,059 ± 0,01 a	- d	- b
M1.1	0,022 ± 0,03 b	0,023 ± 0,02 b	- d	- b
M1.4	0,008 ± 0,01 c	0,004 ± 0,02 c	- d	- b
M1.5	0,026 ± 0,01 b	0,021 ± 0,01 b	- d	- b
M2.3	0,005 ± 0,01 c	0,019 ± 0,02 b	- d	- b
M2.5	0,012 ± 0,01 c	0,020 ± 0,01 b	- d	- b
P3	0,065 ± 0,03 a	0,073 ± 0,01 a	- d	- b
3.5TA	0,010 ± 0,01 c	0,016 ± 0,02 c	0,015 ± 0,01 b	0,007 ± 0,01 a
3.8TA	0,077 ± 0,01 a	0,090 ± 0,01 a	0,028 ± 0,04 b	- b

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra na coluna (minúscula) não diferem estatisticamente entre si.

Os fungos foram cultivados em meio aveia durante 48 horas, em BOD.

O símbolo “-” indica que não houve crescimento.

Esses resultados são semelhantes ao encontrado por Santos (2017), que listou 35 °C como a melhor temperatura de crescimento dos isolados 4.2 e 4.3, apresentando taxa de crescimento igual a $0,339 \text{ cm.h}^{-1}$ e $0,137 \text{ cm.h}^{-1}$, respectivamente, em meio sólido de farelo de trigo.

Carvalho e Silva (2018) em um estudo semelhante observou a melhor temperatura de crescimento do fungo C433 e C333 à 30 °C, com taxa de crescimento igual a 0,014 cm.h⁻¹ e 0,016 cm.h⁻¹, respectivamente e dos isolados C421 e C441 à 35 °C apresentando, respectivamente, taxa de crescimento igual a 0,062 cm.h⁻¹ e 0,134 cm.h⁻¹, em meio Sabouraud.

Enquanto que, Nogueira (2018) observou que a melhor taxa de crescimento foi de 0,003 cm.h⁻¹ do fungo EA138 a 30 °C, em meio sólido composto por xilana e ágar. Silva (2018) observou para o fungo L2 a melhor taxa de crescimento foi de 0,030 cm.h⁻¹ quando esse micro-organismo foi cultivado em meio BDA à temperatura de 30 °C.

A temperatura de crescimento tem papel importante na caracterização dos micro-organismos, pois permitem conhecer o quanto os fungos podem crescer frente à variação de temperatura. A temperatura ótima de crescimento é a temperatura na qual a taxa de crescimento é maior, geralmente os psicrófilos crescem melhor nas temperaturas de 0 °C à 15 °C, os mesófilos nas temperaturas de 25 °C à 35 °C e os termófilos de 40 °C à 60 °C (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Em relação à análise do efeito da temperatura no crescimento dos fungos no meio BDA, pode-se observar que dos vinte e um isolados, dois micro-organismos EA138 e L2 não cresceram em meio BDA (Tabela 4).

Enquanto que, os fungos isolados A4, B8, C421, C433, MB2.4, M1.4, M1.5, P3 e 3.8TA apresentaram melhor taxa de crescimento quando incubados à 30 °C, com taxa de 0,049 cm.h⁻¹, 0,078 cm.h⁻¹, 0,039 cm.h⁻¹, 0,024 cm.h⁻¹, 0,002 cm.h⁻¹, 0,008 cm.h⁻¹, 0,029 cm.h⁻¹, 0,130 cm.h⁻¹ e 0,167 cm.h⁻¹, respectivamente. Assim como, os fungos 4.2, 4.3, C333, C441, MB2.12, MB2.9, M1.1, M2.3, M2.5 e 3.5TA apresentaram melhor temperatura de crescimento à 35 °C, com taxa de 0,063 cm.h⁻¹, 0,038 cm.h⁻¹, 0,046 cm.h⁻¹, 0,038 cm.h⁻¹, 0,032 cm.h⁻¹, 0,037 cm.h⁻¹, 0,010 cm.h⁻¹, 0,109 cm.h⁻¹, 0,043 cm.h⁻¹ e 0,009 cm.h⁻¹, respectivamente. Dos micro-organismos isolados, cinco fungos identificados como 4.2, B8, C333, MB2.12 e M2.5 toleraram a temperatura de 40 °C, sendo que os fungos 4.2 e B8 apresentaram as maiores taxas de crescimento quando incubados a esta temperatura (Tabela 4).

Tabela 4 - Taxa de crescimento (cm.h^{-1}) dos fungos filamentosos em Meio BDA, em diferentes temperaturas.

Fungos	Temperaturas de Crescimento (cm.h^{-1})			
	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C
A4	0,049 ± 0,02 b	- c	- c	- a
4.2	0,048 ± 0,01 b	0,063 ± 0,01 a	0,060 ± 0,01 a	- a
4.3	0,015 ± 0,02 c	0,038 ± 0,01 a	- c	- a
B8	0,078 ± 0,01 a	0,072 ± 0,01 a	0,058 ± 0,01 a	- a
C333	0,022 ± 0,02 c	0,046 ± 0,01 a	0,009 ± 0,01 b	- a
C421	0,039 ± 0,01 b	- c	- c	- a
C433	0,024 ± 0,01 c	- c	- c	- a
C441	0,013 ± 0,03 c	0,038 ± 0,01 a	- c	- a
EA138	- d	- c	- c	- a
L2	- d	- c	- c	- a
MB2.4	0,002 ± 0,01 c	- c	- c	- a
MB2.9	0,014 ± 0,03 c	0,037 ± 0,01 a	- c	- a
MB2.12	0,009 ± 0,03 c	0,032 ± 0,01 a	0,013 ± 0,01 b	- a
M1.1	0,009 ± 0,01 c	0,010 ± 0,01 b	- c	- a
M1.4	0,008 ± 0,01 c	- c	- c	- a
M1.5	0,029 ± 0,02 c	- c	- c	- a
M2.3	0,052 ± 0,02 b	0,109 ± 0,01 a	- c	- a
M2.5	0,015 ± 0,02 c	0,043 ± 0,02 a	0,007 ± 0,01 b	- a
P3	0,130 ± 0,03 a	- c	- c	- a
3.5TA	0,007 ± 0,01 c	0,009 ± 0,01 b	- c	- a
3.8TA	0,167 ± 0,01 a	- c	- c	- a

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra na coluna (minúscula) não diferem estatisticamente entre si.

Os fungos foram cultivados em meio BDA durante 48 horas, em BOD.

O símbolo “-” indica que não houve crescimento.

Esses resultados são semelhantes aos estudos realizados por Souza (2017), que observou a melhor temperatura de incubação de 30 °C para os fungos M1.4, M1.5, M2.3 e M2.5, obtendo taxa de crescimento igual a 0,006 cm.h^{-1} , 0,017 cm.h^{-1} , 0,019 cm.h^{-1} e 0,023 cm.h^{-1} , respectivamente, quando esses micro-organismos foram cultivados em meio BDA.

5.2 Triagem de fungos filamentosos produtores de lipases

Vinte e um fungos filamentosos foram avaliados quanto ao seu potencial de produção e secreção da enzima lipase por meio de ensaios qualitativos em meio sólido. Resultados positivos foram evidenciados pela produção de halos translúcidos no entorno das colônias crescidas em meio específico para a enzima, conforme apresentado na Figura 12. Dos vinte e um, dezesseis (76,19 %) cresceram no meio de cultura sólido específico para lipase, sendo que quatorze não produziram o halo de degradação (Tabela 3).

Sugere-se que estes fungos tenham produzido pouca quantidade de enzima, o suficiente apenas para o seu desenvolvimento no meio de cultura, ou então degradado apenas as moléculas de carboidratos, peptona e outros compostos presentes no meio de cultura o que possibilitou o seu desenvolvimento no meio de cultura. Assim como, cinco fungos identificados como B8, C333, C441, C433 e 3.8TA não cresceram em meio sólido para lipase.

Vale citar que, as cepas MB2.12, P3 e M2.3 apresentaram um maior halo de crescimento, com valores de 3,25 cm, 3,1 cm e 2,3 cm, respectivamente. Porém, não apresentaram halos de atividade lipolítica (Tabela 5).

Entretanto, os fungos promissores para a produção de lipase foram o A4 e o M1.1, sendo que o fungo A4 apresentou maior halo de crescimento, com 1,35 cm e maior halo de atividade lipolítica com 0,5 cm. Enquanto que, o fungo M1.1 apresentou halo de crescimento de 2,3 cm e halo enzimático de 0,3 cm. Após os resultados obtidos nesse experimento foi selecionado o fungo filamentoso identificado como A4 para a produção de lipases (Tabela 5).

Figura 12- Halos formados pela degradação da enzima lipase.



Tabela 5 - Halo de crescimento fúngico (cm) e halo enzimático (cm) produzido pelos fungos filamentosos, incubados à 30 °C, durante quatro dias, em meio sólido para lipase.

Fungos	Halo de crescimento (cm)	Halo enzimático (cm)
A 4	1,35 ± 0,01 h	0,5 ± 0,01 a
4.2	1,25 ± 0,01 i	- b
4.3	1,25 ± 0,02 i	- b
B8	- n	- b
C333	- n	- b
C421	0,9 ± 0,03 k	- b
C433	- n	- b
C441	- n	- b
EA138	1,8 ± 0,01 f	- b
L2	1,35 ± 0,01 h	- b
MB2.4	2,15 ± 0,01 d	- b
MB2.9	2,0 ± 0,02 e	- b
MB2.12	3,25 ± 0,02 a	- b
M1.1	1,3 ± 0,03 h	0,3 ± 0,01 a
M1.4	0,45 ± 0,03 m	- b
M1.5	1,15 ± 0,01 j	- b
M2.3	2,3 ± 0,01 c	- b
M2.5	1,5 ± 0,03 g	- b
P3	3,1 ± 0,01 b	- b
3.5TA	0,75 ± 0,02 l	- b
3.8TA	- n	- b

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra na coluna (minúscula) não diferem estatisticamente entre si. O símbolo “-” indica que não houve crescimento.

A utilização de meios sólidos suplementados com substratos específicos é uma metodologia padrão para a seleção de micro-organismos produtores de enzimas. A sensibilidade, a rapidez e a simplicidade dos testes feitos com os meios suplementados com óleo de oliva facilita a triagem dos micro-organismos produtores de lipase (GUPTA *et al*, 2003).

Para o desenvolvimento do processo de produção de enzimas é de grande importância a seleção de micro-organismos produtores de enzimas extracelulares, visto que estas são mais facilmente recuperadas nas etapas seguintes ao processo fermentativo e dispensam métodos de ruptura de célula que tornam o processo mais dispendioso (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Em um experimento semelhante ao desenvolvido nesse estudo, Colen, Junqueira e Moraes-Santos (2006) observaram que das cinquenta e nove cepas fúngicas isoladas das amostras de solo do norte do estado de Minas Gerais/Brasil, vinte e cinco apresentaram halos lipolíticos em meio de cultura sólido constituído de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 %; $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 0,2 %; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 %; NaCl 0,1 %; sais biliares 0,2 %; extrato de levedura 0,05 %; ágar 1,5 %; óleo de oliva 1 %.

Vale citar, que diversos micro-organismos, dentre bactérias, leveduras e fungos, apresentam a capacidade de produzir e secretar grandes quantidades de lipases (TREVISAN, 2004). Assim como, Jaeger e Reetz (1998) em um estudo semelhante listaram algumas bactérias e fungos que já foram estudados e têm suas lipases utilizadas comercialmente, dentre estes, destacam-se os fungos *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei*.

Essa capacidade de secretar grandes quantidades de enzimas para o meio de cultivo de alguns fungos filamentosos tem estimulado pesquisas para o desenvolvimento de fermentação em larga escala, purificação enzimática e técnicas de biologia molecular (AGGER *et al.*, 2002; PEIXOTO, 2004).

Dessa forma, o desenvolvimento de estudos de novas linhagens de micro-organismos produtores de enzimas de interesse biotecnológico mostra-se como uma etapa importante nos processos de pesquisa onde serão empregadas. Entre as enzimas fúngicas importantes destacam-se as amiloglicosidases, produzidas por linhagens de *Aspergillus e Rhizopus*; amilases, que transformam amido em dextrinas e oligossacarídeos e podem ser isoladas por fermentação de linhagens de *A. niger*; reninas; lipases, que catalisam reversivelmente a hidrólise de triacilgliceróis sob condições naturais, podendo catalisar a transesterificação e a síntese estereoespecífica de ésteres em um grande número de substratos (PASTORE; MACEDO, 2004).

5.3 Otimização do meio de cultura para a produção enzimática pelo fungo isolado selecionado e análise do tempo de cultivo

Analisando os resultados obtidos, observou-se que o fungo isolado A4 apresentou uma maior atividade lipolítica no meio Khanna após 120 horas de cultivo, com atividade de 2,32 U totais. Por sua vez, o meio de cultivo Vogel apresentou atividade lipolítica de 2,19 U totais após 72 horas de cultivo, seguido do meio Adams que apresentou uma atividade lipolítica de 2,01 U totais após 96 horas de cultivo. Já o meio SR apresentou atividade lipolítica de 1,14 U totais após 120 horas de cultivo. (Tabela 6 e Gráfico 1).

Então, optou-se pela padronização do meio de cultivo submerso Khanna, uma vez que foi o meio de cultivo com maior atividade lipolítica no quinto dia de crescimento do micro-organismo (Tabela 6 e Gráfico 1).

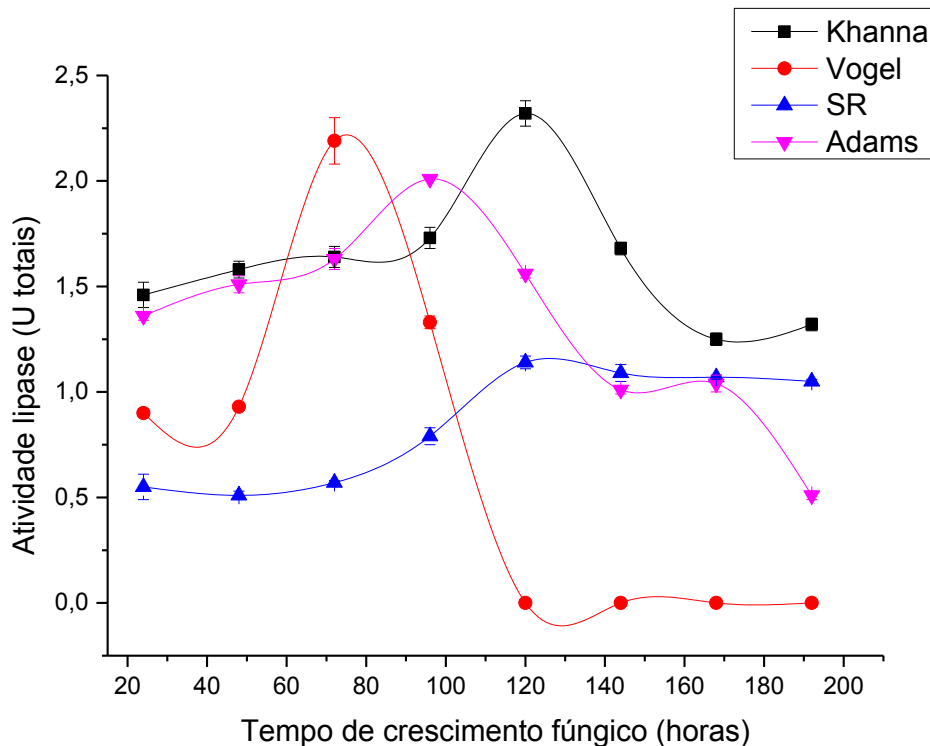
Tabela 6 - Determinação do meio de cultura e tempo de crescimento do fungo isolado A4 para produção de lipases.

Tempo (horas)	Meios de Cultivo			
	Khanna	Vogel	SR	Adams
24	1,43 ± 0,06 c A	0,90 ± 0,02 c A	0,55 ± 0,06 c A	1,36 ± 0,02 c A
48	1,58 ± 0,04 b A	0,93 ± 0,00 c A	0,51 ± 0,02 c B	1,51 ± 0,04 b A
72	1,64 ± 0,05 b B	2,19 ± 0,11 a A	0,57 ± 0,01 c C	1,63 ± 0,05 b B
96	1,73 ± 0,05 b B	1,33 ± 0,03 b B	0,79 ± 0,04 b C	2,01 ± 0,00 a A
120	2,32 ± 0,06 a A	0,00 ± 0,00 d C	1,14 ± 0,03 a B	1,56 ± 0,02 b B
144	1,68 ± 0,03 b B	0,00 ± 0,00 d D	1,09 ± 0,04 a C	1,01 ± 0,02 d C
168	1,25 ± 0,03 d A	0,00 ± 0,00 d C	1,07 ± 0,01 a A	1,04 ± 0,04 d A
192	1,32 ± 0,03 c B	0,00 ± 0,00 d D	1,05 ± 0,01 a A	0,51 ± 0,02 e C

O fungo foi cultivado em meios Adams, Khanna, Vogel, M5 e SR, por oito dias, à 30 °C, em estufa bacteriológica sem agitação

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra na coluna (minúscula) ou linha (maiúscula) não diferem estatisticamente entre si.

Gráfico 1 – Determinação do meio de cultura e tempo de crescimento do fungo isolado A4 para produção de lipases.



O fungo foi cultivado em meios Adams, Khanna, Vogel, M5 e SR, por oito dias, à 30 °C, em estufa bacteriológica sem agitação.

Grandes quantidades de enzimas específicas são requeridas em processos industriais. A produção enzimática deve ser máxima, para tanto, são necessários estudos de otimização do meio de cultivo. Isso porque, a incubação por um curto período pode não resultar na produção máxima da enzima de interesse. Da mesma forma, cultivos por um longo período podem levar ao esgotamento dos nutrientes, levando a um declínio da produção enzimática, além da morte celular (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). Cada micro-organismo possui seu melhor tempo de crescimento para a produção e secreção de lipases, o que pode ainda ser influenciado pelas condições de cultivo e composição do meio de cultura (VICI, 2008).

Colen (2006) salienta que para cultivar um micro-organismo é necessário empregar uma fonte de energia, disponibilizar nutrientes que forneçam materiais essenciais para a formação de biomassa, evitar a presença de inibidores de crescimento e submetê-lo as condições ambientais favoráveis. Desta forma, a formulação dos meios de cultura atende aos três primeiros parâmetros, que conjuntamente às condições ambientais nas quais o micro-organismo é cultivado, contribuem significativamente para a viabilidade do inóculo.

Alguns fungos requerem ainda fatores de crescimento, principalmente vitaminas, além de micronutrientes como o ferro, zinco, cobre, manganês e molibidênio, que são essenciais para seu crescimento. Em consequência, alguns inóculos podem perder a viabilidade em decorrência do não fornecimento destes elementos em um meio de cultura sintético (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004, COLEN, 2006).

Os fatores do ambiente, como temperatura, grau de umidade, pH e aeração, têm grande influência sobre o crescimento dos fungos, de modo que, distintas espécies possuem diferentes ótimos e podem crescer dentro de uma faixa para cada fator. Todos esses fatores ambientais podem se converter em fatores de estresse para o fungo ou mesmo restringir seu crescimento quando se afastam da faixa ótima requerida pela espécie (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004).

Nos estudos realizados com lipases fúngicas, os micro-organismos, quando cultivados em meio líquido, são incubados na maioria das vezes sob agitação, como nos estudos feitos por Vici (2008) que realizou um estudo semelhante com o fungo *B. brongniartii*, estipulando o meio Khanna como o melhor meio de cultivo em fermentação submersa, temperatura de 30 °C e tempo de 72 horas de incubação, sob agitação orbital de 100 rpm. Shu, Yang e Yan (2007) utilizaram o tempo de 80 horas de cultivo para *A. niger* em meio líquido contendo maltose 1,5 %, extrato de carne 1,25 %, (NH₄)₂SO₄ 0,1 %, K₂HPO₄ 0,2 %, MgSO₄.7H₂O 0,01 % e azeite de oliva 4 % sob agitação de 250 rpm e temperatura de 28 °C. Hiol *et al.* (2000) mantinham as culturas de *Rhizopus oryzae* em meio de cultura contendo licor de maceração de milho 4 %, peptona 1 %, KH₂PO₄ 1,4 %, K₂PO₄ 0,24 % e MgSO₄ 0,04 %, sob agitação de 100 rpm e temperatura de 28 °C, registrando o tempo de 96 horas como melhor tempo de cultivo para a produção e secreção de lipases. Cada micro-organismo possui seu melhor tempo de crescimento para a produção e secreção de lipases, o que pode ainda ser influenciado pelas condições de cultivo e composição do meio de cultura.

Em um estudo parecido Bancercz, Ginalska e Fiedurek (2005) cultivou o micro-organismo *P. chrysogenum* em meio de cultura contendo 10 g de glicose, 6 g de K₂HPO₄, 1 g de MgSO₄, 4 g de ureia, 10 mg de FeCl₃.6H₂O, 8 µg D-biotina, 200 µg de tiamina, 4 µg de mio-inositol e 10 % de azeite de oliva, por 120 horas a 20 °C em agitador rotativo a 150 rpm. Messias *et al.* (2009) relatou o cultivo do micro-organismo *Botryosphaeria* sp, em meio líquido contendo sais Vogel e óleo de soja 1 %, temperatura de 28 °C, em agitador rotativo a 180 rpm por 120 horas. Tempo de cultivo semelhante ao obtido pelo fungo isolado A4.

Esses resultados mostram que cada fungo requer uma condição específica de cultivo para a indução e secreção de lipases, reforçando a importância de se estudar o efeito de algumas condições nos processos fermentativos.

5.4 Determinação das fontes de nitrogênio do meio de cultura para produção enzimática

A fonte de nitrogênio, assim como a fonte de carbono, influencia tanto no crescimento como na produção enzimática. Analisando-se a massa micelial produzida, pode-se dizer que o meio sem fonte de nitrogênio apresentou biomassa inferior 0,122 g, quando comparada ao meio de controle com extrato de levedura, 0,166 g. As massas miceliais para os meios suplementados com peptona, ureia e KNO_3 foram 0,177 g, 0,192 g e 0,174 g, respectivamente, sendo esses valores maiores quando comparados com o meio controle e o meio sem fonte de nitrogênio (Tabela 7).

Os meios que continham as combinações de fontes de nitrogênio, o fungo apresentou biomassas maiores que o meio controle e o meio sem fonte de nitrogênio, sendo 0,174 g para extrato de levedura mais peptona, 0,239 g para extrato de levedura mais ureia, 0,235 g para ureia mais peptona, 0,185 g para KNO_3 mais extrato de levedura, 0,215 g para KNO_3 mais peptona, 0,216 g para KNO_3 mais ureia (Tabela 7).

Para as combinações entre três fontes de nitrogênio, obteve-se os seguintes valores de biomassas do fungo, 0,217g para ureia mais peptona mais extrato de levedura, 0,174 g para ureia mais peptona mais KNO_3 , 0,202 g para ureia mais extrato de levedura mais KNO_3 e 0,143 g para peptona mais extrato de levedura mais KNO_3 . E por fim, obteve-se 0,207 g de massa micelial para o meio que continha a combinação entre as quatro fontes de nitrogênio ureia, peptona, extrato de levedura e KNO_3 (Tabela 7). Dessa forma, podemos dizer que a fonte de nitrogênio influencia tanto no crescimento quanto na produção lipolítica do microorganismo, mas não é um fator crucial, pois mesmo o meio sem fonte de nitrogênio o fungo isolado A4 foi capaz de se desenvolver e secretar a enzima lipase para o meio de cultivo.

A importância do nitrogênio no crescimento micelial foi observada por Kim *et al.* (2002), que utilizaram fontes de nitrogênio inorgânicas e orgânicas e concluíram que as orgânicas foram as melhores fontes pra incrementar a produção de biomassa. Assim, a suplementação do meio de cultivo com fonte de nitrogênio é de grande importância, uma vez que este atua na síntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e de algumas vitaminas pelo fungo.

Analisando os resultados obtidos, pode-se dizer que as fontes de nitrogênio alteraram significativamente o pH da solução, sendo o valor de pH final do meio controle contendo extrato de levedura, aproximadamente, 9 % maior que o meio sem fonte de nitrogênio. Para o meio contendo peptona observou-se um valor de pH final igual a 4,73, o que mostra uma acidez do meio, enquanto que os meios contendo ureia e KNO_3 apresentam pH final próximo da neutralidade, apresentando os valores de 7,16 e 6,31, respectivamente (Tabela 7).

Para os meios contendo duas ou mais combinações entre as fontes de nitrogênio observou-se os seguintes valores de pH final: 5,36 para extrato de levedura mais peptona; 5,40 para extrato de levedura mais ureia; 5,83 para peptona mais ureia; 6,19 para KNO_3 mais extrato de levedura; 6,29 para KNO_3 mais peptona e 6,53 para KNO_3 mais ureia. Enquanto que, os valores de pH final dos meios contendo ureia mais peptona mais extrato de levedura; ureia mais peptona mais KNO_3 ; ureia mais extrato de levedura mais KNO_3 e peptona mais extrato de levedura mais KNO_3 foram 6,14, 6,18, 6,24 e 6,25, respectivamente. O meio contendo ureia mais peptona mais extrato de levedura mais KNO_3 apresentou pH final igual a 5,95 (Tabela 7).

Ao analisar a influência da fonte de nitrogênio no cultivo do fungo isolado A4 para produção lipolítica, observou-se que todas as fontes de nitrogênio do meio foram indutoras de atividade enzimática, assim como, verificou-se que o micro-organismo não depende de fonte de nitrogênio para obtenção de atividade enzimática, visto que o meio que não continha fonte de nitrogênio a atividade lipolítica foi de 1,00 U totais (Tabela 7 e Gráfico 2). Observou-se que a fonte de nitrogênio influencia tanto no crescimento quanto na produção lipolítica do micro-organismo, mas não é um fator crucial, pois mesmo o meio sem fonte de nitrogênio o fungo isolado A4 foi capaz de se desenvolver e secretar a enzima lipase para o meio de cultivo.

O fungo isolado A4 teve produção lipolítica semelhante tanto na presença de extrato de levedura (original do meio de cultivo Khanna) como na presença de KNO_3 , ureia mais peptona mais extrato de levedura e ureia mais peptona mais KNO_3 , com níveis superiores em meio contendo ureia mais peptona mais KNO_3 , com atividade de 2,25 U totais (Tabela 7 e Gráfico 2).

Na presença de extrato de levedura mais ureia, a produção enzimática também foi considerável, com 5,71 % a menos quando comparado ao controle (extrato de levedura).

Os resultados obtidos no Gráfico 2 demonstraram que o fungo isolado A4 teve a maior produção de lipases em meio suplementado com a combinação entre peptona, ureia e KNO_3 , cuja atividade foi 7,14 % maior que o controle (extrato de levedura), 3,21 % maior que

a fonte de nitrogênio KNO_3 e 1,8 % maior que a combinação entre as fontes ureia, peptona e extrato de levedura. Apesar de não ter diferença significativa quando comparado com outras fontes de nitrogênio analisadas, optou-se por substituir a fonte de nitrogênio original do meio Khanna por peptona, ureia e KNO_3 na concentração de 0,1 %.

Tabela 7 - Efeito da fonte de nitrogênio na produção de lipases.

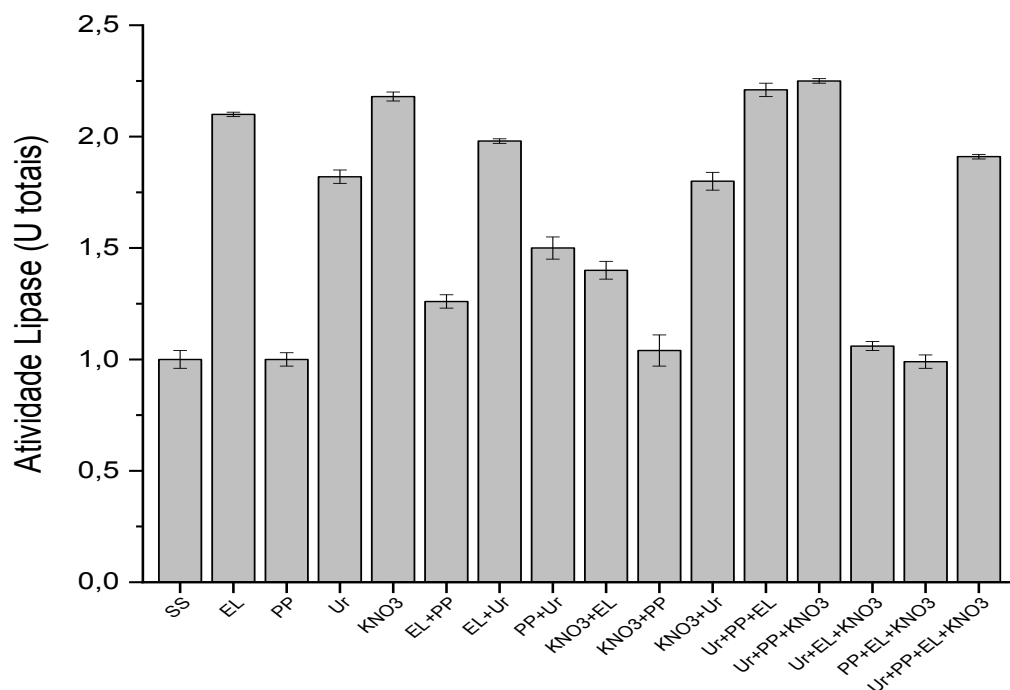
Fontes de Nitrogênio	Massa Micelial (g)	pH final extrato extracelular	Atividade enzimática (U totais)
Sem fonte de nitrogênio	0,122	4,09	1,00 ± 0,04 b
Extrato de levedura	0,166	4,46	2,10 ± 0,01 a
Peptona	0,177	4,73	1,00 ± 0,03 b
Ureia	0,192	7,16	1,82 ± 0,03 b
KNO_3	0,174	6,31	2,18 ± 0,02 a
EL + PP	0,174	5,36	1,26 ± 0,03 b
EL + Ur	0,239	5,40	1,98 ± 0,01 a
PP + Ur	0,235	5,83	1,50 ± 0,05 b
KNO_3 + EL	0,185	6,19	1,40 ± 0,04 b
KNO_3 + PP	0,215	6,29	1,04 ± 0,07 b
KNO_3 + Ur	0,216	6,53	1,80 ± 0,04 b
Ur + PP + EL	0,217	6,14	2,21 ± 0,03 a
Ur + PP + KNO_3	0,174	6,18	2,25 ± 0,01 a
Ur + EL + KNO_3	0,202	6,24	1,06 ± 0,02 b
PP + EL + KNO_3	0,143	6,25	0,99 ± 0,03 b
Ur + PP + EL + KNO_3	0,2K07	5,95	1,91 ± 0,01 b

O fungo foi inoculado em meio Khanna contendo azeite de oliva como fonte de carbono, por cinco dias, à 30 °C, em estufa bacteriológica sem agitação.

SS- sem fonte de nitrogênio; EL- extrato de levedura; PP- Peptona; Ur-Ureia.

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra na coluna (minúscula) não diferem estatisticamente entre si.

Gráfico 2 - Efeito da fonte de nitrogênio na produção de lipases.



O fungo foi inoculado em meio Khanna contendo azeite de oliva como fonte de carbono, por cinco dias, à 30 °C, em estufa bacteriológica sem agitação.

SS- sem fonte de nitrogênio; EL- extrato de levedura; PP- Peptona; Ur-Ureia.

Um estudo semelhante com o fungo *P. chrysogenum* foi realizado por Bancercz; Ginalska; Fiedurek (2005), nesse trabalho a melhor fonte de nitrogênio para a produção de lipases foi ureia, sendo esta cerca de 15 vezes maior quando comparado ao fungo cultivado com extrato de levedura ou peptona. Lima *et al.* (2003) demonstraram que para *P. aurantio-griseum* a melhor fonte de nitrogênio para a produção de lipases foi sulfato de amônio 1 %.

Vários estudos estão sendo realizados para melhorar a atividade enzimática fazendo combinações de fontes de nitrogênio. Na literatura, a utilização de fontes orgânicas de nitrogênio como peptona, extrato de levedura e biomassas de resíduos agroindústrias estão sendo utilizadas e vem sendo significativas quanto a sua atividade enzimática. Mahadik *et al.* (2002) analisou fungos filamentosos produtores de lipase e encontrou maior atividade e massa micelial, sendo de 18,0 U.mL⁻¹ e 1.060 mg/100 mL de meio, respectivamente, após 72 horas de fermentação à 30 °C em meio de cultivo composto de extrato de levedura 0,1 %, bacto-peptona 0,5 % adicionado de 1,0 % de glicose, 1,0 % de óleo de oliva, 0,5 % de Triton X100 e alguns sais minerais.

5.5 Determinação da solução de sais do meio de cultura para crescimento do fungo isolado A4 e produção enzimática

O crescimento e a produção enzimática de um micro-organismo podem apresentar interferências quando são adicionadas fontes salinas ao meio de cultura. Analisando-se a massa micelial produzida, pode-se dizer que o meio sem fontes de sais apresentou biomassa de 0,212 g, aproximadamente 178 % menor que a biomassa do meio contendo solução de sais Khanna (meio controle) que obteve 0,591 g de massa micelial. As massas miceliais para o meio contendo solução de sais CP, SR e Vogel foram 0,197 g, 0,478 g e 0,654 g, respectivamente. Os valores de biomassas para os meios contendo combinações entre duas ou mais fontes de sais foram relativamente maiores quando comparados com o meio controle e sem fonte de sais, os valores obtidos para os meios contendo sais CP mais sais SR; sais CP mais sais Vogel; sais CP mais sais Khanna; sais SR mais sais Vogel; sais SR mais sais Khanna; e sais Vogel mais Khanna foram 0,467 g, 0,819 g, 0,624 g, 0,839 g, 0,765 g e 0,980 g, respectivamente. Para os meios contendo sais CP mais sais SR mais sais Vogel; sais CP mais sais SR mais sais Khanna; sais CP mais sais Vogel mais sais Khanna e sais SR mais sais Vogel mais sais Khanna os valores das massas miceliais obtidas foram de 0,943 g, 0,568 g, 0,952 g e 0,609 g, respectivamente. Enquanto que o meio contendo a combinação entre as soluções CP mais sais SR mais sais Vogel mais sais Khanna apresentou 0,702 g de biomassas (Tabela 8).

Os resultados obtidos de pH final (Tabela 8) para o meio contendo sais Khanna foi de 4,66, aproximadamente 12 % menor que o obtido para o meio sem sais (5,24). Para os meios contendo sais CP, sais SR e sais Vogel os valores de pH obtidos foram de 6,29, 5,27 e 5,40, respectivamente, observando uma leve acidez desses meios. Já os meios contendo solução de sais CP mais sais SR; sais CP mais sais Vogel; sais CP mais sais Khanna; sais SR mais sais Vogel, sais SR mais sais Khanna e sais Vogel mais sais Khanna apresentaram os respectivos valores de pH 5,16; 5,78; 4,63; 5,75; 4,71 e 5,82. Os meios contendo três ou mais combinações de soluções de sais obteve os seguintes valores de pH final, 6,18 para o meio contendo solução de sais CP acrescido de sais SR mais sais Vogel; 5,02 para sais CP mais sais SR mais sais Khanna, 5,88 para sais CP mais sais Vogel mais sais Khanna, 5,89 para sais SR mais sais Vogel mais sais Khanna e 6,57 para CP mais SR mais sais Vogel mais sais Khanna.

Todas as fontes analisadas apresentaram alguma atividade enzimática extracelular. A produção enzimática na ausência de sais foi de 0,23 U totais, sendo este valor bem menor quando comparado com o meio controle contendo sais Khanna que apresentou valor de atividade de 2,20 U totais, o que sugere que o fungo isolado A4 necessita de um cultivo enriqueci-

do com fontes salinas para a obtenção de uma boa atividade enzimática (Tabela 8 e Gráfico 3).

Os resultados obtidos mostraram que a produção enzimática utilizando solução de sais Vogel foi de 15,73 U totais, esse valor foi bem maior quando comparado com as outras soluções de sais analisadas e com o meio controle.

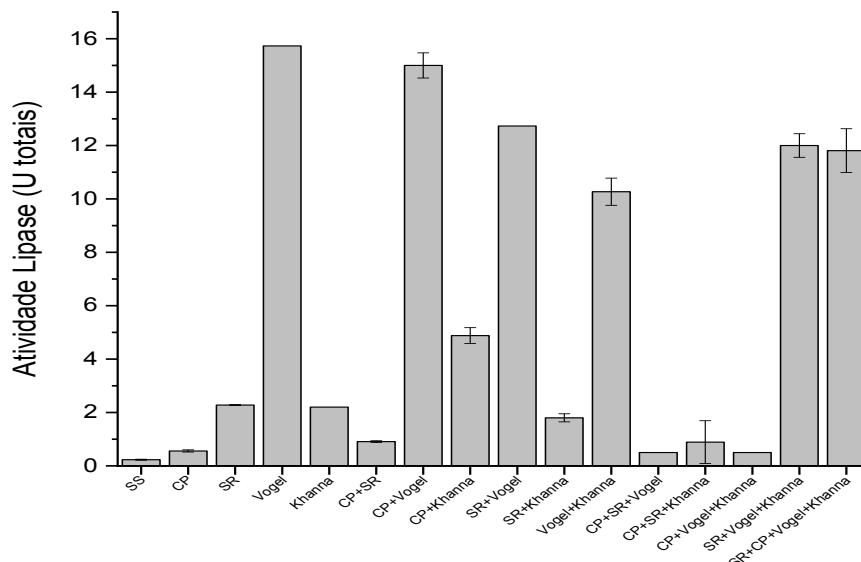
Dessa forma, o meio de cultura com adição de sais Vogel foi escolhido como ótimo para o crescimento e produção enzimática pelo fungo filamentososo A4.

Tabela 8 - Análise da influência de diferentes fontes de sais para a produção lipolítica a partir do fungo isolado A4.

Fonte de Sais	Massa Micelial (g)	pH final extrato extracelular	Atividade enzimática (U totais)
Sem sais	0,212	5,24	0,23 ± 0,02 d
CP	0,197	6,29	0,56 ± 0,04 d
SR	0,478	5,27	2,28 ± 0,02 c
Vogel	0,654	5,40	15,73 ± 0,00 a
Khanna	0,591	4,66	2,20 ± 0,00 c
CP+SR	0,467	5,16	0,91 ± 0,03 c
CP+Vogel	0,819	5,78	15,00 ± 0,47 a
CP+Khanna	0,624	4,63	4,88 ± 0,30 c
SR+Vogel	0,839	5,75	12,73 ± 0,00 a
SR+Khanna	0,765	4,71	1,80 ± 0,15 c
Vogel+Khanna	0,980	5,82	10,23 ± 0,51 b
CP+SR+Vogel	0,943	6,18	0,50 ± 0,00 d
CP+SR+Khanna	0,568	5,02	0,89 ± 0,08 c
CP+Vogel+Khanna	0,952	5,88	0,50 ± 0,00 d
SR+Vogel+Khanna	0,609	5,89	12,00 ± 0,44 a
CP+SR+Vogel+Khanna	0,702	6,57	11,81 ± 0,82 a

O fungo foi inoculado em meio Khanna contendo azeite de oliva como fonte de carbono, ureia+peptona+KNO₃ como fonte de nitrogênio, mantido por cinco dias, à 30°C, de forma estacionária em estufa bacteriológica. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra na coluna (minúscula) não diferem estatisticamente entre si.

Gráfico 3 - Análise da influência de diferentes fontes de sais para a produção lipolítica a partir do fungo isolado A4.



O fungo foi inoculado em meio Khanna contendo azeite de oliva como fonte de carbono, ureia+peptona+KNO₃ como fonte de nitrogênio, mantido por cinco dias, à 30 °C, em estufa bacteriológica sem agitação. SS- sem fonte de nitrogênio

5.6 Determinação do pH inicial do meio de cultura para a produção enzimática

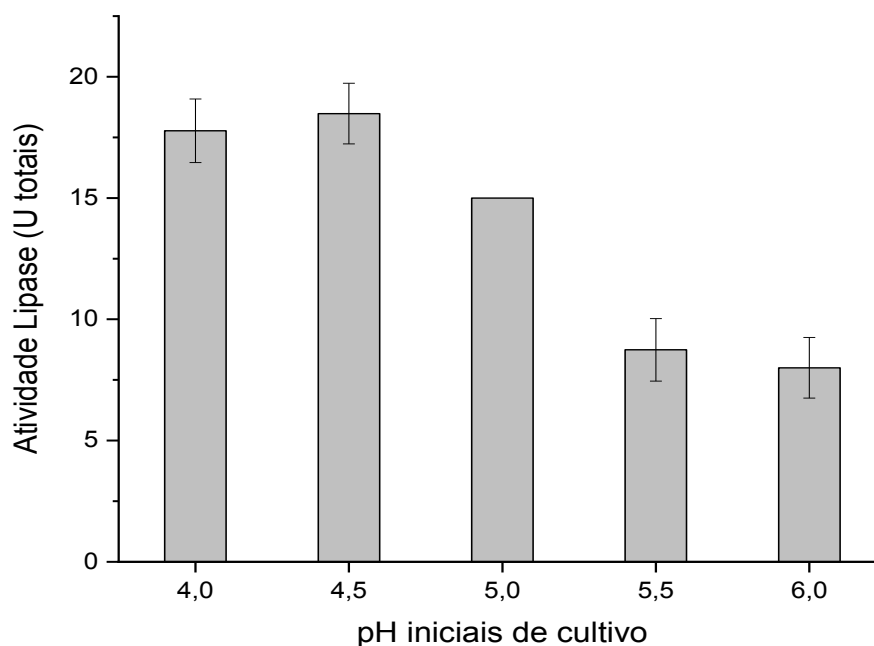
A tabela 9 mostra o efeito do pH inicial do meio de cultura sobre o crescimento e a produção enzimática do fungo isolado A4. Analisando as massas miceliais os valores obtidos foram de 1,31 g, 1,25 g, 1,26 g, 1,29 g e 1,25 g para os meios com pH 4; pH 4,5; pH 5; pH 5,5 e pH 6, respectivamente.

Os resultados mostraram que a atividade lipolítica em meio Khanna com sais Vogel e pH inicial 4,5 foi de 18,48 U totais, esse valor foi, aproximadamente, 23 % maior que o valor obtido para o meio controle (pH 5,0) e 4 % maior que o meio com pH 4,0 (Tabela 9 e Gráfico 4).

Tabela 9 - Efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de lipases.

pH inicial do meio de cultivo	Massa Micelial (g)	pH final extrato extracelular	Atividade Enzimática (U totais)
4,0	1,31	4,34	17,77 ± 1,54 a
4,5	1,25	4,82	18,48 ± 1,54 a
5,0	1,26	5,30	15,00 ± 0,00 b
5,5	1,29	5,78	8,74 ± 0,45 c
6,0	1,25	6,27	8,00 ± 0,77 c

O fungo foi inoculado em meio Khanna contendo azeite de oliva como fonte de carbono, ureia+peptona+KNO₃ como fonte de nitrogênio, sais Vogel, mantido por cinco dias, à 30 °C, em estufa bacteriológica sem agitação. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra na coluna (minúscula) não diferem estatisticamente entre si.

Gráfico 4 - Efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de lipases.

O fungo foi inoculado em meio Khanna contendo azeite de oliva como fonte de carbono, ureia+peptona+KNO₃ como fonte de nitrogênio, sais Vogel, mantido por cinco dias, à 30 °C, em estufa bacteriológica sem agitação.

Kamini *et al.*, (2000) realizou estudo semelhante com o micro-organismo *Cryptococcus sp.*, neste trabalho as condições ótimas para crescimento e produção da lipase foi em pH inicial 5,6 e temperatura 25 °C, após 120 horas de cultivo, embora pH inicial 4,0-7,0 também favorecesse a produção da enzima. No entanto, a produção de lipase pelo fungo *Cryptococcus sp.* caiu significativamente em pH inicial 3,0.

Geralmente, o pH ótimo para produção de lipases por linhagens fúngicas varia entre 4,0 e 5,0 confirmando a preferência destes micro-organismos por ambientes mais ácidos. Em valores de pH acima de 5,0 os fungos filamentosos não conseguem se desenvolver de forma adequada e, conseqüentemente, a produção de enzimas é reduzida. Os valores de pH para lipases normalmente se refere ao inicial do processo de cultivo, visto que, o pH pode variar consideravelmente dependendo da fonte de nitrogênio e o tempo de cultivo (KALOGERIS *et al.*, 2003).

5.7 Análise do efeito da fonte de carbono do meio de cultura para a produção lipolítica

A fonte de carbono é um componente do meio de cultura que tem grande influência na produção enzimática, pois é ela que induz ou inibe a produção e secreção de determinadas enzimas. A fonte de lipídios influencia tanto no crescimento do micro-organismo como na indução da produção de lipases. Objetivando testar a influência de diferentes óleos como fonte de carbono e indutor da produção de lipases pelo fungo estudado, realizou-se um experimento utilizando óleos de origens diferentes nos meios de cultura.

Comparando os resultados obtidos quando o fungo isolado A4 foi incubado em meio de cultura com óleo de oliva (controle) observou-se que o micro-organismo teve maior produção enzimática em meio contendo óleo de canola, óleo de girassol e óleo de algodão, apresentando, respectivamente, os seguintes valores de atividades, 148,48 U totais, 135,62 U totais e 171,36 U totais (Tabela 10 e Gráfico 5).

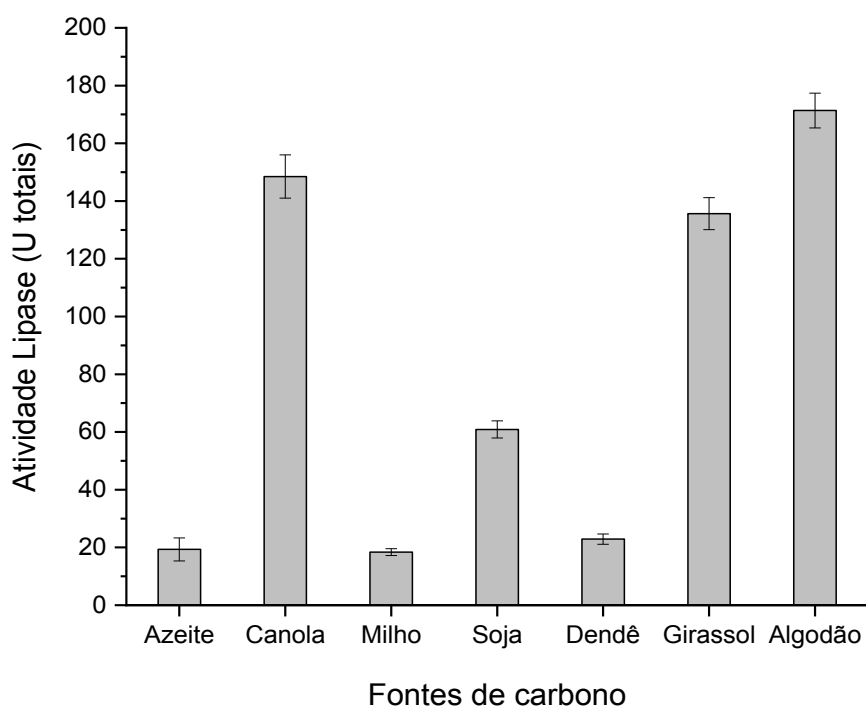
A atividade enzimática do meio de cultura suplementado com óleo de algodão foi, aproximadamente, 45 % maior que a atividade no meio contendo óleo de azeite (controle) como fonte de carbono.

Tabela 10 - Análise da ação de diferentes fontes de carbono na produção de lipases pelo fungo isolado A4.

Fonte de Carbono	Atividade enzimática (U totais)
Azeite	19,33 ± 3,98 d
Canola	148,48 ± 7,49 b
Milho	18,39 ± 1,18 d
Soja	60,88 ± 2,96 c
Dendê	22,88 ± 1,80 d
Girassol	135,62 ± 5,55 b
Algodão	171,36 ± 6,01 a

O fungo foi inoculado em meio Khanna contendo ureia+peptona+KNO₃ como fonte de nitrogênio, sais Vogel, pH inicial de cultivo 4,5, mantido por cinco dias, à 30 °C, de forma estacionária em estufa bacteriológica. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra na coluna (minúscula) não diferem estatisticamente entre si.

Gráfico 5 - Análise da ação de diferentes fontes de carbono na produção de lipases pelo fungo isolado A4.



O fungo foi inoculado em meio Khanna contendo ureia+peptona+KNO₃ como fonte de nitrogênio, sais Vogel, pH inicial de cultivo 4,5, mantido por cinco dias, à 30 °C, em estufa bacteriológica sem agitação.

A literatura mostra que fontes de carbono lipídicas são essenciais para o crescimento do fungo e, também, para obter um alto rendimento de lipases (SHARMA *et al.*, 2001), uma vez que a atividade lipásica tem sido detectada em meio de cultura que contém substratos lipídicos (óleo de oliva, ácido oleico, tributirina e óleo de soja), o que sugere que a enzima seja induzida por esses substratos (DEIVE *et al.*, 2003).

Óleos de origens diferentes apresentam uma composição distinta de ácidos graxos, assim como concentrações diferentes dos mesmos lipídios, podendo influenciar de forma distinta o crescimento fúngico e a produção de lipases (VICI, 2008). Quando o fungo isolado A4 foi cultivado em diferentes óleos, teve maior produção de lipases no meio com óleo de algodão.

Vários autores reportam a produção de lipases por fungos e bactérias em cultivo submerso suplementado com óleo de oliva, sendo que alguns trabalhos mencionam azeite de palma, Tween 20 e 40, trioleína e tripalmitina, óleos de soja, algodão, girassol e milho como fonte de carbono para a produção de lipases microbianas. O *Cordyceps brongniartii* apresentou uma boa produção de lipases quando incubado em meio contendo óleo de canola, milho e gergelim (VICI, 2008). Enquanto que, o fungo *A. niger* teve melhor atividade específica quando cultivado em meio suplementado com óleo de gergelim, óleo de girassol e azeite de dendê e o fungo *Penicillium purpurogenum* teve melhor crescimento em óleo de macaúba, óleo de soja e óleo de girassol (VICI, 2008).

Vários isolados de *Botryosphaeria spp.* apresentaram crescimento em diferentes óleos vegetais entre eles babaçu, canola, algodão, girassol e azeite de oliva (MESSIAS *et al.*, 2009). Em um estudo semelhante Lima *et al.* (2003) estudaram o uso de óleo de oliva, soja, milho e girassol, obtendo maior produção de lipases por *P. aurantiogriseum* com óleo de oliva.

Bancerz, Ginalska e Fiedurek (2005) fizeram um experimento semelhante ao deste trabalho para o fungo *P. chrysogenum*, obtendo melhor resultado utilizando óleo de milho, óleo de oliva ou trioleína como fonte indutora da produção de lipases. Enquanto que, D'Annibale *et al.* (2006) estudaram para *C. cylindracea* o efeito da adição de óleo de oliva, óleo de milho e óleo de soja ao meio de cultivo, obtendo melhor produção de lipases em meio suplementado com óleo de oliva. Por sua vez, Colin, Baigori e Pera (2010) também obtiveram maior produção de lipases por *A. niger* MYA 135 utilizando óleo de oliva em comparação aos óleos de uva, soja, milho e girassol. Messias *et al.* (2009) obtiveram melhor produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* em meio suplementados com ácido oleico.

6. CONCLUSÕES

A análise de temperatura em meio aveia e BDA foi realizada com vinte e um fungos filamentosos isolados. Os micro-organismos em meio Aveia com maiores taxas de crescimento a diferentes temperaturas foram o 3.8 A, P3, B8, 4.2, MB2.12 e MB2.9, e em meio BDA, foram o 3.8TA, P3, M2.3, B8 e 4.2.

O fungo isolado A4 foi selecionado através da triagem de micro-organismos produtores de lipases. A realização dessa triagem foi de extrema importância para a seleção do micro-organismo foco desse estudo.

Dos fungos estudados para a produção lipolítica, o fungo isolado A4 foi o que apresentou melhores níveis enzimáticos de lipases com maior atividade em meio submerso Khanna modificado com 120 horas de incubação, à 30 °C, otimizada com óleo de algodão, ureia+peptona+KNO₃ como fonte de nitrogênio, solução de sais Vogel e pH inicial 4,5.

Os resultados deste trabalho foi muito representativo, pois possibilitou a seleção de cepas com potencial para a produção de lipase. Apesar de alguns micro-organismos não apresentarem atividade lipolítica nos testes realizados, estes podem ser utilizados em outros trabalhos no laboratório para a produção de outras enzimas.

O estudo de otimização da fermentação submersa se mostrou necessário, pois acarretou num aumento do rendimento de lipase pelo fungo avaliado. Conseguiu-se selecionar um fungo com capacidade para a produção de lipases.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P.R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. **Mycopathologia**, v. 112, p 35-37, 1990.
- AGGER, T.; PETERSEN, J.B.; O'CONNOR, S.M.; MURPHY, R.L.; KELLY, Y.M.; NIELSEN, J. Physiological characterization of recombinant *Aspergillus nidulans* strain with different ceA genotypes expressing *A. oryzae* α -amylase. **J. Biotechnol.**, v. 92, p. 279-285, 2002.
- AHMED, S. et al. Production and Purification of Cellulose-degrading enzymes from Filamentous Fungi *Trichoderma harzianu*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p.1411-1419, fev. 2009.
- AIRES-BARROS, M. R.; TAIPA, M. Â.; CABRAL, J. M. S. **Em Lipases – their structure, biochemistry and application**; Woolley, P.; Petersen, S. B., eds.; Cambridge University Press: Cambridge, 1994, cap. 12.
- ALBERTON, D. **Produção de Lipases por Fermentação no Estado Sólido visando à Aplicação no Tratamento de Efluente de Laticínios**. 2009. 173p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Programa de Pós-graduação em Ciências, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W., BLACKWELL, M. B. **Introductory Micology**. 4th. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- ALMEIDA, A. F. DE. Produção, purificação e propriedades bioquímicas de lipase ácida. **Tese de doutorado**, 2012.
- ALMEIDA, R.V. Clonagem e expressão do gene de uma lipase de *Pirococcus furiosus* em *Escherichia coli*. Dissertação (Mestrado). COPPE/Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.
- ALMEIDA, R. V. **Clonagem, expressão, caracterização e modelagem estrutural de uma esterase termoestável de *Pyrococcus furiosus***. 2005. 132f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- ALVES, M. H. et al. Screening of *Mucor* spp. for the Production of Amylase, Lipase, Polygalacturonase and Protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p.325-330, dez. 2002.
- ANTCZAK, M. S. et al. Enzymatic biodiesel synthesis: Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 11-85-1194, 2009.
- AZEREDO, L. A. I. et al. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. **Current Microbiology**, v. 54, p.361-365, 2007.
- BANCERZ, R.; GINALSKA, G.; FIEDUREK, J.; GROMADA, A. Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9'. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 32, p. 253- 260, 2005.

BARON, A.M. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, 2008.

BARR, D. J. S. Phylum Chytridiomycota. In: **Handbook of Protoctista**. 1st. ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1990. p. 454–456.

BELUR, P. D.; MUGERAYA, G. Microbial Production of Tannase: State of the Art. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p.25-40, jan. 2011.

BISEN, P. S.; SANODIYA, B. S.; THAKUR, G. S.; BAGHEL, R. K.; PRASAD, G. B. K. S. Biodiesel production with special emphasis on lipase catalyzed transesterification. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 8, p. 1019–1030, 2010.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3...5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p.426-438, 2011.

BON, E. P. S.; PEREIRA JÚNIOR, N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; RESEIRO, J. C. R.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Org.) **Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BORNSCHEUER, U. T.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, S. H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 433–437, 2002.

BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Editora Blucher, v. 1, 2001. 279. p..

BUENO, P. R. M.; DE OLIVEIRA, T. F.; CALIARI, M.; CASTIGLIONI, G. L.; JUNIOR, M. S. S. Selection and optimization of extracellular lipase production using agroindustrial waste. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 566–573, 2014.

BUSSAMARA, R.; FUENTEFRIA, A. M.; OLIVEIRA, E. S.; BROETTO, L.; SIMCIKOVA, M.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. July, p. 268–275, 2010.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. The Fungi. London: **Academic Press Limited.**, 482 p., 1994.

CARVALHO, K. M. G. De. Hidrólise enzimática do óleo de amêndoas de tucumã na síntese de biodiesel etílico via processo hidrólise-esterificação. **Dissertação de mestrado**, 2014. p. 130f.

CARVALHO, A. C.O. Características físico-químicas de óleos vegetais comestíveis puros e adulterados. **Dissertação de mestrado**, 2017.

CARVALHO E SILVA, C. H. Coleta, isolamento e análise termofílica de fungos filamentosos isolados no lixão da UFVJM – Campus JK. **Trabalho de conclusão de curso**, 2018.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146–156, 2004.

CAVALCANTI, E. D. C.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M.G.; CASTILHO, L. R.; SANT'ANNA JÚNIOR, G. L. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 79-83, 2005. Número especial.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R.G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.22, n. 8, p. 881-885, 2006.

COLIN, V.L.; BAIGORI, M.D.; PERA, L.M. Effect of environmental conditions on extracellular lipases production and fungal morphology from *Aspergillus niger* MYA 135. **J. Basic Microbiol.**, v. 50, p. 52-58, 2010.

COLLA, L.M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C.O.; BERTOLIN, T.E.; VIEIRA COSTA, J.A. 2010. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v.101: 8308 -14.

CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. G.; CARVALHO, P. O. *Aspergillus sp.* lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 3-4, p. 163–171, 2010.

CORTEZ, D.V., CASTRO,H.F., ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 85-96, 2016.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.

DAMASO, M. C. T. et al. Utilization of Agroindustrial Residues for Lipase Production by Solid-State Fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p.676-681, nov. 2008.

D'ANNIBALE, A.; SERMANNI, G.G., FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresour. Technol.**, v. 97, p. 1828-1833, 2006.

DEACON, J. W. **Fungal Biology**. 4th. ed. Edinburgh: Blackwell Publishing, 2006.

DEIVE, F. J.; COSTAS, M.; LONGO. M. A. Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology letters**, v. 25, p. 1403-1406, 2003.

DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. – Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme Microb Technol.** **39**: 1042-50, 2006.

DZIEZAK, J. D. Enzymes: catalysts for food processes. **Food Technol.**, v. 45, p. 78-85, 1991.

EMERSON, R. **An experimental study of the life cycles and taxonomy of Allomyces.** *Lloydia*, 4:77-144, 1941.

ERICSSON, D. J., et al. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase: A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of molecular biology**, v. 376(1), p.109–19, 2008.

FANGRUI, M.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, n. 1, p. 8–13, 2007.

FROST, G. M.; MOSS, D. A. **Em Biotechnology volume 7a: Enzyme Technology**; Rehm, H.-J.; Reed, G., eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 1987, cap. 3.

FUKUDA, H. et al. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. **Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo.** In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Orgs) *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.* Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p. 125-172.

GOMIDE, F. T. F. **Otimização de produção, purificação e caracterização parcial de lipases produzidas pela levedura *Moniliella spathulata* R25L270.** Dissertação (Mestrado). Departamento de Bioquímica e Imunologia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

GOW, N.A.R.; GADD, G.M. *The growing fungus.* London. **Chapman; Hall.** 473 p., 1995.

GUPTA, R.; RATHI, P.; GUPTA, N; BRADDOO, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 37, p. 63-71, 2003.

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 69, p. 375-384, 2005.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of Filamentous Fungi for Production of Enzymes of Biotechnological Interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p.474-480, jul. 2006.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia, New York**, v. 67, n. 3, p. 597-607, Nov/Dec. 1975.

HARDING, K.G. et al. A life-cycle comparison between inorganic and biological catalysis for the production of biodiesel. **Journal of Cleaner Production**, v. 16, p. 1368-1378, 2007.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. April 2005, p. 235–251, 2006.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1422–1432, 2009.

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, B.; CORDOVA, J.; BARZANA, E.; FAVELA-TORRES, E. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 61, n. 3-4, p. 136–142, 2009.

HIBBETT, D. S. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the fungi. **Mycological Research III**, p. 509-547, mar. 2007

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

IWASHITA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. **J. Biosci. Bioeng.** v. 94, n. 6, p. 530-535, 2002.

JAEGER, K. E. & EGGERT, T. – Lipases for biotechnology. **Curr Opin Biotechnol.** **13**: 390-397, 2002.

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

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial Pectinolytic enzymes: A Review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, mar. 2005.

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J. (2003), Performance of an intermittent agitation rotating drumtype bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresour. Technol.**, 86, 207–213.

KAMINI, N. R. *et al.* Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp S-2, **Process Biochemistry**, v. 36, p. 317-324, 2000.

KHANNA, P.; SUNDARI, S.S; KUMAR, N.J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.11, p 242-243, 1995.

KIM, S. W.; HWANG, H. J.; XU, C. P.; NA, Y. S.; SONG, S. K.; YUN, J. W.; Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. **Lett. Appl. Microbiol.**, 34: 389-393, 2002.

KORMAN, T.P.; SAHACHARTSIRI, B.; CHARBONNEAU, D.M.; HUANG, G.L.; BEAUREGARD, M.; BOWIE, J.U. Dieselzymes: development of a stable and metanol tolerant lipase for biodiesel production by directed evolution. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, 2013.

LI, N.; ZONG, M. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Lipases from the genus *Penicillium* : Production , purification , characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 43–54, 2010.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M.I.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Effect of Nitrogen and Carbon Sources on Lipase Production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 41, n. 2, p. 105-110, 2003.

LOGUERCIO-LEITE, C.; ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Orgs) **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p. 15-88.

LOGUERCIO-LEITE, C.; et al. **A particularidade de ser um fungo**. Biotermas, 2006.

LOPES, P. H. S. Produção de β -D-frutofuranosidases pelo fungo filamentososo *Aspergillus sp.* P4 isolado no norte de Minas Gerais. **Trabalho de conclusão de curso**, 2017.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G.M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. v. 17, n. 2, p. 115-119, 1997.

MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciências Agrotecnicas**, Lavras, v. 29, n. 4, p.833-838, jul. 2005.

MACIEL, V. F. A.; PACHECO, T. F.; GONÇALVES, S. B. **Padronização do uso do corante rodamina B para avaliação de atividade lipolítica em estirpes fúngicas**. (Comunicado Técnico), n. 5, Brasília: Embrapa, 2010.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016. 1032 p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock. Biology of microorganisms**. 9. ed. New Jersey: *Prentice Hall*. Cap. 2000. 17: 729-733.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V.; **Process Biochem.**, 38, 715, 2002.

MAHAN, B. M.; MYERS, R. J. **Química um curso universitário**. 4. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2009. 682 p.

MALDONADO, R. R., LOPES, D. B., AGUIAR-OLIVEIRA, E., KAMIMURA, E. S., MACEDO, G. A., 2016. A review on geotrichum lipases: production, purification, immobilization and applications. **Chem. Biochem. Eng.** 30 (4), 439-454.

MARINHO, B. M. **Produção de lipase por novas linhagens de fungos filamentosos**. Curso de farmácia. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2011.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 386p.

MEDEIROS, G. A.; GONCALVES, S. B.; RODRIGUES, D. S.; NETO, B. A. Enzimas e Líquidos Iônicos: Uma combinação promissora para um biodiesel limpo. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 74–94, 2013.

MEHER, L. C. et al. Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Pongamia pinnata* oil for production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1392-1397, 2006.

MESSIAS, J.M.; COSTA, B.Z.; LIMA, V.M.G.; DEKKER, R.F.H.; REZENDE, M.I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A.M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 45, p. 426-431, 2009.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina**, v. 32, n. 3, p. 213–234, 2011.

MICHELIN, M. **Potencial dos fungos *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* no desenvolvimento de bioprocessos e propriedades das enzimas xilanolíticas**. Ribeirão Preto, 2009. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

MOHAMED, S. A.; ABDEL-MAGEED, H. M.; TAYEL, S. A.; EL-NABRAWI, M. A.; FAHMY, A. S. Characterization of *Mucor racemosus* lipase with potential application for the treatment of cellulite. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 642–648, 2011.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MORTON, J. B. Fungi. In: SILVIA, D. M. et al. **Principles and Applications of Soil Microbiology**. 2 ed. New Jersey: Pearson, 2005. p. 141-161.

NASCIMENTO, C. S., Otimização da produção de lipase e celulase por fermentação submersa utilizando a torta da polpa e fungos isolados do fruto da macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Dissertação de mestrado**, 2015.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger. Princípios de bioquímica. Quarta edição. **Sarvier editora**. 2006.

NOGUEIRA, E. A. Análise de características de fungos filamentosos prospectados no lixão da UFVJM campus JK, Diamantina, MG. **Trabalho de conclusão de curso**, 2018.

O'BRIEN, R. **Fat and oils: formulating and processing for applications**. 3rd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2009.

OLIVEIRA, F., MOREIRA, C., SALGADO, J.M., ABRUNHOSA, L., VENÂNCIO, A., BELO, I., 2016. Olive pomace valorization by *Aspergillus* species: lipase production using solid-state fermentation. **J. Sci. Food Agric.** 96 (10), 3583-3589.

OLIVEIRA, M. M. C. Isolamento de fungos filamentosos obtidos de amostras do rio doce e do mar coletada em Regência, município de Linhares, estado do Espírito Santo, e padroniza-

ção do cultivo do micro-organismo MB2.7 para a produção de lipases. **Trabalho de conclusão de curso**, 2019.

PANDEY, N., DHAKAR, K., JAIN, R., PANDEY, A., 2016. Temperature dependent lipase production from cold and pH tolerant species of *Penicillium*. **Mycosphere**, 7(10), 1533-1545.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Review. Biotechnol. Adv.**, v. 22, n. 3, p. 189-259, 2004.

PASTORE, G.L.; MACEDO, G. A. Utilização dos fungos na indústria de alimentos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004. p. 311-334.

PATEL, R. N. Microbial / enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enz. Microbial Technol.** v. 31, p. 804-826, 2002.

PEIXOTO, S.C. **Estudos comparativos entre amilases produzidas em cultivo submerso e em substrato sólido pelo fungo termotolerante *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis***. Purificação e caracterização enzimática. Ribeirão Preto, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia conceitos e aplicações. São Paulo. **Pearson Makron Books**. Segunda edição, v. 1, 524 p., 1996.

PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; GOMES, A. L. **Contribuição para o conhecimento de Chytridiomycota da “Reserva Biológica de Paranapiacaba”**, Santo André, SP, Brasil Resultados e Discussão. v. 7, [s.d.].

PIZARRO, A. V.L.; PRAK, E.Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching Earth. **Process Biochem.**, v. 38, p. 1077-1082, 2003.

PROSKOVÁ, A.; KOPICOVÁ, Z.; KUCERA, J.; SKARKOVÁ, L. Lipase-catalyzed transesterification of rendering plant fat – short communication. **Research in Agricultural Engineering**, v. 56, n. 3, p. 122-125, 2010.

RAJESH, E. M. et al. Investigation of Lipase Production by *Trichoderma reesei* and Optimization of Production Parameters. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, n. 7, p.1177-1189, 2010.

REIS, P. et al. **Lipases at interfaces: A review. Advances in Colloid and Interface Science**, v.147-148, p.237-250, 2009.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M. D.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, v. 2011, 16p, 2011.

RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H.F.; RECHIA, C.G.V.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and properties of a thermostable extracellular-D-xylosidase produced by thermo-

tolerant *Aspergillus phoenicis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.26, p. 96-100 156-160, 2001.

RIYADI, F.A., ALAM, M.Z., SALLEH, M.N., SALLEH, H.M., 2017. Optimization of thermostable organic solvent-tolerant lipase production by thermotolerant *Rhizopus* sp. using solidstate fermentation of palm kernel cake. **3 Biotech**, 7 (5), 300.

ROBLES-MEDINA A. *et al.* Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 398-408, 2009.

RODRIGUES, R. C. Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual. **Tese de doutorado**, 2009.

ROSA, T. M. F.; MARINHO, B. M.; BENASSI, V. M. Produção de celulases e formação de açúcares fermentescíveis pela degradação do bagaço de cana-de-açúcar. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, Jaboticabal (sp), v. 9, n. 1, p. 38-43, 2017.

SALVADOR, A. A. *et al.* **Biodiesel: aspectos gerais e produção enzimática**. 2009.

SANDOVAL, G.; RIVERA, I.; CASAS, L.; SÁNCHEZ, I.; Biodiesel synthesis from waste lipids catalyzed by immobilized lipases. In: CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA 13., 2009, Acapulco. **Trabajos...** Acapulco: Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, 2009.

SANTOS, A. M. A., Produção de celulases a partir de fungos filamentosos cultivados em meio contendo resíduos de bananeira. **Trabalho de conclusão de curso**, 2017.

SCHMIDELL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. Fermentação Descontínua. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, v. 2, cap. 9, p. 193-204.

SCHUCHARDT, U. *et al.* Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 1, p. 199-210, 1998.

SELWAL, M. K. *et al.* Tannase production by *Penicillium atramentosum* KM under SSF and its applications in wine clarification and tea cream solubilization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 24, p.374-387, 2011.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnol. Adv.**, v.19, p.627-662, 2001.

SHARMA, R. *et al.* Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Fuel**, v. 87, p. 2355-2373, 2008.

SHARMA, R. *et al.* Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p.2083-2094, ago. 2009.

SHU, Z.Y.; YANG, J.K.; YAN, Y.J. Purification and characterization of a lipase from

Aspergillus niger F044. **Chin. J. Biotech.**, v. 23, p. 96-100, 2007.

SILVA, et al. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 321-326, 2005.

SILVA, M. T. Produção de β -D-frutofuranosidases por *Aspergillus* sp. MT2.4. **Trabalho de conclusão de curso**, 2017.

SILVA, L. T. A. Produção e caracterização bioquímica de amilases produzidas por *Penicillium* sp. L1 isolado em Janaúba – MG. **Trabalho de conclusão de curso**, 2018.

SILVA, R. P.; COELHO, G. D. **Fungos – Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas**, 2006. Disponível em: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Ricardo_Silva_e_Glaucian_e_Coelho.pdf>. Acesso em 22 de Maio de 2019.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. **Overview of fungal lipase: a review. Applied biochemistry and biotechnology**, v.166, n. 2, p.486–520, 2012.

SOUZA, M. T. S. Prospecção de fungos filamentosos e produção de amilases por *Aspergillus* sp. M1.7.2. **Trabalho de conclusão de curso**, 2017.

TEDERSOO L, SÁNCHEZ–RAMÍREZ S, KOLJALG U et al. 2018 – High–level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. **Fungal Diversity** 90, 135–159.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10th. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TREICHEL, H. et al. A Review on Microbial Lipases Production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p.182-196, 2010.

TREVISAN, H.C. Lipases. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. **Enzimas como agente Biotecnológico**. 1. ed. Ribeirão Preto: **Editora Legis Summa**, p. 115-135, 2004.

TSUJISAKA, Y.; IWAI, M.; FUKUMOTO, J.; OKAMOTO, Y; **Agric. Biol. Chem.** 1973, 37, 837.

VALENTE, A. M.; ALEXANDRE, V. M.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 483–488, 2010.

VICI, A. C. – **Estudos de lipases produzidas pelos fungos Ascomycota *Aspergillus niger*, *Cordyceps brongniartii* e *Penicillium purpurogenum***. Monografia apresentada a Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, USP, 2008.

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

VOGEL, H.F. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. **Am. Nat.**, v. 98, p. 435-446, 1964.

WANG, L. et al. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2006.

WENZEL, J. B.; MORESCO, A. A. A.; BOAS, E. V.; BURIN, F. A. G.; SOUZA, R. O. Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de soja. **Perspectivas online, Ciências biológicas da saúde**, v. 9, n. 3, p. 1–15, 2013.

WIJAYAWARDENE NN, HYDE KD, AL-ANI LKT, TEDERSOO L, HAELEWATERS D et al. 2020 – Outline of *Fungi* and fungus-like taxa. **Mycosphere** 11(1), 1060-1456, Doi 10.5942/mycosphere/11/1/8.

YANG, K. S. et al. Catalytic properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 6, p. 599-604, 2009.