

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIA

JULIO PANSIERE ZAVARISE

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LIPASES  
PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS**

SÃO MATEUS – ES

2021

JULIO PANSIERE ZAVARISE

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LIPASES  
PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia do Centro Universitário Norte do Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Energia, na área de concentração Engenharia, Tecnologia e Gestão.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Laura Marina Pinotti.

SÃO MATEUS – ES

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

Z11p Zavarise, Julio Pansiere, 1996-  
Produção e caracterização bioquímica de lipases produzidas por fungos filamentosos / Julio Pansiere Zavarise. - 2021.  
58 f.

Orientadora: Laura Marina Pinotti.  
Dissertação (Mestrado em Energia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo.

1. Enzimas de fungos. 2. Fermentação. 3. Micélio. 4. Cinética enzimática. 5. Hidrólise. I. Pinotti, Laura Marina. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. III. Título.

CDU: 620.9

---

JULIO PANSIERE ZAVARISE

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LIPASES  
PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Energia.

Aprovada em 09 de novembro de 2021.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Laura Marina Pinotti  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora

---

Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Porto  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Prof. Dr. Jairo Pinto de Oliveira  
Universidade Federal do Espírito Santo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
LAURA MARINA PINOTTI - SIAPE 1550305  
Departamento de Engenharia e Tecnologia - DET/CEUNES  
Em 22/11/2021 às 18:30

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/313356?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
PAULO SERGIO DA SILVA PORTO - SIAPE 1545509  
Departamento de Engenharia e Tecnologia - DET/CEUNES  
Em 28/11/2021 às 11:49

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/317521?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
JAIRO PINTO DE OLIVEIRA - SIAPE 3831306  
Departamento de Morfologia - DM/CCS  
Em 29/11/2021 às 15:55

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/318460?tipoArquivo=O>

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, José e Maria Madalena, e ao meu irmão, Gustavo, pelo amor e incentivo em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, a professora Dr<sup>a</sup>. Laura Marina Pinotti pela orientação prestada e pelos valiosos ensinamentos.

A todos os meus familiares e amigos pelo carinho e estímulo.

Aos alunos de Iniciação Científica, Beatriz Guisso Gomes, Wallefer Rodrigues Barbosa e Daleth Silva Oliveira, e ao colega de mestrado, Henrique Belei Neto pela disposição em auxiliar a realização desse trabalho.

À UFES – Universidade Federal do Espírito Santo – pelo apoio institucional e a CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pelo suporte financeiro.



## RESUMO

O custo de produção e purificação das lipases é considerado como um entrave para sua aplicação ostensiva em processos industriais. De forma alternativa as lipases purificadas, podem ser empregadas as lipases ligadas ao micélio (lipases intracelulares) e o caldo fermentado com lipases extracelulares, ambas produzidas por fungos filamentosos. Nesse contexto, existe uma aparente lacuna de pesquisa sobre a produção simultânea de tais formas múltiplas de lipases por fungos filamentosos. Diante disso, o objetivo do presente estudo é investigar o potencial de produção de lipases intracelulares e extracelulares a partir de três cepas fúngicas (*Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* F02 e *Trichoderma koningii*) e realizar a caracterização bioquímica das lipases produzidas. O cultivo submerso dos fungos filamentosos foi realizado em Erlenmeyers, com azeite de oliva como fonte de carbono. As atividades (intracelular e extracelular) foram determinadas pelo método de hidrólise do azeite de oliva. O efeito da concentração do substrato, pH e temperatura sobre as atividades lipásicas foram avaliados. Os resultados obtidos indicam que o *T. koningii* apresentou a máxima atividade lipásica intracelular (81,5 UI/g de biomassa seca), enquanto para a atividade lipásica extracelular (10,6 UI/ml de caldo fermentado) esta foi encontrada para o *A. niger*. A análise das atividades específicas (razão entre a atividade lipásica e a concentração de biomassa seca) indicou que o *Trichoderma* apresentou um comportamento diferenciado, com indícios de que há uma forte retenção de lipases no micélio. Os valores dos parâmetros cinéticos determinados para as lipases produzidas, com a emulsão de azeite de oliva comercial como substrato, variaram de 68,24 a 469,04mM para o  $K_m$  e de 5,58 a 37,88 UI para o  $V_{máx}$ . A análise estatística indicou que o efeito do pH na atividade lipásica intracelular do *T. koningii* foi cerca de 13 vezes maior que o efeito da temperatura. As temperaturas reacionais na faixa de 37°C a 44°C e o pH de 7,8 a 8,0 favoreceram as atividades das lipases produzidas pelo *T. koningii*.

Palavras-Chave: *Trichoderma koningii*. *Aspergillus niger*. Extrato bruto de lipases. Micélio. Cinética enzimática.

## ABSTRACT

The cost of production and purification of lipases is considered as an obstacle to their ostentatious application in industrial processes. Alternatively, purified lipases can be used lipases bounded to mycelium (intracellular lipases) and broth fermented with extracellular lipases, both produced by filamentous fungi. In this context, there is an apparent research gap on the simultaneous production of such multiple forms of lipases by filamentous fungi. Therefore, the aim of this study is to investigate the production potential of intracellular and extracellular lipases from three fungal strains (*Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* F02 and *Trichoderma koningii*) and perform biochemical characterization of the lipases produced. The submerged cultivation of filamentous fungi was carried out in Erlenmeyers, with olive oil as a carbon source. The activities (intracellular and extracellular) were determined by the hydrolysis method of olive oil. The effect of substrate concentration, pH and temperature on lipasic activities were evaluated. The results obtained indicate that *T. koningii* presented the maximum intracellular lipasic activity (81.5 IU/g of dry biomass), while for extracellular lipasic activity (10.6 IU/ml of fermented broth) this was found for *A. niger*. The analysis of specific activities (ratio between lipase activity and dry biomass concentration) indicated that *Trichoderma* presented a differentiated behavior, with indications that there is a strong retention of lipases in mycelium. The values of the kinetic parameters determined for the lipases produced, with the emulsion of commercial olive oil as substrate, ranged from 68.24 to 469.04mM for  $K_m$  and from 5.58 to 37.88 IU for  $V_{max}$ . Statistical analysis indicated that the effect of pH on intracellular lipasic activity of *T. koningii* was about 13 times greater than the effect of temperature. The reaction allocated temperatures in the range of 37°C to 44°C and the pH from 7.8 to 8.0 favored the activities of lipases produced by *T. koningii*.

Keywords: *Trichoderma koningii*. *Aspergillus niger*. Crude extract of lipases. Mycelium. Enzymatic kinetics.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Esquema do metabolismo do triacilglicerol pela enzima lipase. (a) atuação regiosseletiva e (b) atuação não-regiosseletiva.....   | 11 |
| Figura 2 – Representação esquemática de uma $\alpha/\beta$ -hidrolase.....  | 12 |
| Figura 3 – Mecanismo proposto via simulação computacional para a ativação interfacial da lipase M37.....  | 15 |
| Figura 4 – a) Perfil de atividade lipásica para a lipase intracelular de <i>Aspergillus niger</i> b) Gráfico duplo-recíproco correspondente.....  | 36 |
| Figura 5 – a) Perfil de atividade lipásica para a lipase extracelular de <i>Aspergillus niger</i> e b) Gráfico duplo-recíproco correspondente.....  | 37 |
| Figura 6 – a) Perfil de atividade lipásica para a lipase intracelular de <i>Trichoderma koningii</i> e b) Gráfico duplo-recíproco correspondente.....   | 37 |
| Figura 7 – a) Perfil de atividade lipásica para a lipase extracelular de <i>Trichoderma koningii</i> e b) Gráfico duplo-recíproco correspondente.....   | 37 |
| Figura 8 – a) Perfil de atividade lipásica para a lipase extracelular de <i>Penicillium sp.</i> e b) Gráfico duplo-recíproco correspondente.....  | 38 |
| Figura 9 – a) Perfil de atividade lipásica para a lipase extracelular de <i>Penicillium sp.</i> e b) Gráfico duplo-recíproco correspondente.....  | 38 |
| Figura 10 – Gráficos de probabilidade normal de resíduos e distribuição dos resíduos para lipases intracelulares (a e b, respectivamente) e lipases extracelulares (c e d, respectivamente) .....                                     | 43 |
| Figura 11 – Superfícies resposta obtidas a partir do planejamento experimental completo $3^2$ . a) Superfície resposta para a atividade lipásica intracelular e b) Superfície de resposta para a atividade lipásica extracelular..... | 44 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – pH e Temperatura ótimos para lipases produzidas pelos gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Trichoderma</i> descritos na literatura (2010 – atual) .....                      | 24 |
| Tabela 2 – Parâmetros cinéticos ( $K_m$ e $V_{máx.}$ ) de lipases produzidas pelos gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Trichoderma</i> descritos na literatura (2010 – atual) .....    | 25 |
| Tabela 3 – Parâmetros de estabilidade térmica ( $K_d$ e $t_{1/2}$ ) de lipases produzidas pelos gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Trichoderma</i> na literatura (2010 – atual) ..... | 26 |
| Tabela 4 – Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental completo $3^2$ para avaliação do efeito da temperatura e do pH sobre a atividade lipásica.....                                     | 29 |
| Tabela 5 – Matriz do planejamento experimental com valores codificados e valores em unidades reais dos fatores (Temperatura e pH) e as respectivas respostas (atividades lipásicas) .....               | 30 |
| Tabela 6 – Atividade lipásica intracelular determinada para os microrganismos estudados sob cultivo submerso.....   | 31 |
| Tabela 7 – Atividade lipásica extracelular determinada para os microrganismos estudados sob cultivo submerso.....   | 32 |
| Tabela 8 – Concentração de biomassa seca determinada para os microrganismos estudados sob cultivo submerso.....   | 33 |
| Tabela 9 – Atividade lipásica extracelular específica para os microrganismos estudados sob cultivo submerso.....  | 34 |
| Tabela 10 – Atividade lipásica intracelular específica para os microrganismos estudados sob cultivo submerso.....   | 34 |
| Tabela 11 – Atividades lipásicas para as lipases intracelulares e extracelulares produzidas pelo <i>Trichoderma koningii</i> sob cultivo submerso nas diferentes condições de Temperatura e pH.....     | 40 |
| Tabela 12 – Tabela dos efeitos estatisticamente significativos para a atividade lipásica do micélio de <i>Trichoderma koningii</i> .....  | 41 |
| Tabela 13 – Tabela dos efeitos estatisticamente significativos para a atividade lipásica do caldo fermentado de <i>Trichoderma koningii</i> .....   | 41 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| Quadro 1 – Parâmetros determinados para as lipases extracelulares produzidas sob cultivo submerso..... | 38 |
| Quadro 2 – Parâmetros determinados para as lipases intracelulares produzidas sob cultivo submerso..... | 39 |

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

A – atividade lipásica

b – massa de biomassa seca

c – volume de caldo fermentado

DEA – Departamento de Engenharia Ambiental

EC – *Enzyme Commission*

ES – Espírito Santo

FDA – *Food and Drug Administration*

FES – fermentação em Estado Sólido

FS – fermentação Submersa

GRAS – *Generally Regarded as safe*

INCQS – Instituto Nacional Controle e Qualidade em Saúde

IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

$K_d$  – constante de desativação térmica

$K_m$  – constante de Michaelis

LABSAN – Laboratório de Saneamento Ambiental

M – molar

PDA – *Potato Dextrose Agar*

pH – potencial hidrogeniônico

p-NPB – butirato de p-nitrofenila

p-NPP – palmitato de p-nitrofenila

rpm – rotações por minuto

SP – São Paulo

t – tempo

$t_{1/2}$  – tempo de meia vida

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

UI – unidade de lipase

UK – *United Kingdom*

USA – *United States of America*

$V_{m\acute{a}x.}$  – velocidade máxima de reação

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| RESUMO.....  | 4  |
| ABSTRACT .....   | 5  |
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 7  |
| 2 OBJETIVOS .....  | 9  |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....   | 9  |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 9  |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 10 |
| 3.1 LIPASES .....  | 10 |
| 3.1.1 Definição .....  | 10 |
| 3.1.2 Ativação Interfacial das lipases .....                                 | 12 |
| 3.1.3 Aplicações Industriais.....  | 14 |
| 3.2 PRODUÇÃO DE LIPASES.....   | 15 |
| 3.3 PRODUÇÃO DE LIPASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS.....                         | 16 |
| 3.3.1 Lipases produzidas por <i>Penicillium sp.</i> .....                    | 17 |
| 3.3.2 Lipases produzidas por <i>Aspergillus sp.</i> .....                    | 18 |
| 3.3.3 Lipases produzidas por <i>Trichoderma sp.</i> .....                    | 20 |
| 3.4 LIPASES LIGADAS AO MICÉLIO .....   | 21 |
| 3.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LIPASES .....                               | 22 |
| 4 METODOLOGIA.....   | 26 |
| 4.1 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....   | 26 |
| 4.1.1 Microrganismos e obtenção do inóculo .....                             | 26 |
| 4.1.2 Meio de cultivo .....  | 26 |
| 4.1.3 Produção enzimática via Fermentação Submersa.....                      | 26 |
| 4.1.4 Determinação da atividade lipásica.....                                | 27 |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PARAMÊTROS BIOQUÍMICOS DAS LIPASES<br>PRODUZIDAS..... | 28 |
| 5 RESULTADOS .....   | 30 |
| 5.1 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....   | 30 |
| 5.2 CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA SECA.....                                       | 32 |
| 5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA.....   | 35 |
| 5.3.1. Efeito da concentração de substrato .....                             | 35 |
| 5.3.2. Efeito dos parâmetros físico-químicos (Temperatura e pH) .....        | 39 |
| CONCLUSÕES .....   | 44 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 45 |

## 1 INTRODUÇÃO

O uso das enzimas pelos seres humanos não é algo recente, porém a crescente necessidade de desenvolver processos industriais eficientes, com menores impactos ambientais e economia de recursos energéticos, maximizou a importância da biocatálise nas últimas décadas (FERREIRA-LEITÃO et al., 2017). Para ser empregue como biocatalisador uma enzima deve ser solúvel, estável, ativa e fácil de produzir e é sabido que nem todas as enzimas possuem esses atributos (ALFARO-CHÁVEZ et al., 2019).

A maior parte (75%) das enzimas industriais são classificadas como hidrolases. Estas enzimas são capazes de catalisar a clivagem hidrolítica de ligações C–O, C–N e C–C (International Union of Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB, 2020a), sendo as proteases, amilases, celulasas e lipases as hidrolases mais importantes (DEMAIN; SÁNCHEZ, 2017).

As lipases são reconhecidas por catalisarem a hidrólise de triglicerídeos sobre a interface água-óleo, liberando ácidos graxos e glicerol (VILLENEUVE et al., 2000). Em contrapartida, as lipases também podem catalisar reações de síntese, como a transesterificação, esterificação e a interesterificação em meios não-aquosos (SNELLMAN; SULLIVAN; COLWELL, 2002). Tal propriedade torna as lipases extremamente interessantes e reconhecidas como os biocatalisadores do futuro (MEHTA; BODH; GUPTA, 2017).

As lipases encontram potenciais aplicações na síntese de fármacos, na indústria de alimentos, na biorremediação de solos contaminados, no pré-tratamento de efluentes gordurosos e na síntese de biodiesel (MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2019). Algumas estimativas apontam que o mercado global de lipases pode atingir US\$ 797,7 milhões em 2025, com uma taxa de crescimento constante de 2017 a 2025 (BCC RESEARCH, 2020). Como pôde ser notado, o mercado de lipases é expressivo, porém o custo elevado dessas enzimas continua a ser o principal obstáculo para uma maior expansão (MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2019).

O custo das lipases está fortemente relacionado com a sua fonte de obtenção (plantas, animais e microrganismos). Uma das vantagens das lipases



microbianas é a sua facilidade de cultivo e manipulação dos microrganismos, especialmente bactérias, leveduras e fungos filamentosos (MEHTA; BODH; GUPTA, 2017). Os fungos filamentosos são capazes de produzir lipases extracelulares e estáveis em larga escala. Estas enzimas podem ser facilmente recuperadas do meio de produção, o que diminui o seu custo em relação a outras fontes (SHARMA; SHARMA; SAXENA, 2016; MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2019).

Como alternativa às lipases convencionais pode-se empregar o micélio com atividade lipásica (lipases ligadas ao micélio) ou o caldo fermentado com lipases extracelulares estáveis como biocatalisadores. Em algumas aplicações industriais, estas formas de lipases podem ser empregadas sem passar por processos complexos de isolamento enzimático e purificação. Isso pode contribuir para a redução da perda de atividade enzimática e diminuir o custo global dos processos biocatalisados por lipases.

Ainda, podem ser encontradas certas espécies de fungos filamentosos que exibem formas múltiplas de lipases (COLEN, 2006). Estas lipases podem apresentar diferentes parâmetros bioquímicos e cinéticos, estabilidades térmicas e diferentes pHs e Temperaturas ótimas (NAESSENS; VANDAMME, 2003) e, portanto, verificam-se inúmeras oportunidades de pesquisa quanto a identificação e caracterização bioquímica de lipases de fungos filamentosos pouco estudados ou completamente desconhecidos.

O presente trabalho objetivou avaliar o potencial de produção de lipases (intracelulares e extracelulares) de três fungos filamentosos e realizar a caracterização bioquímica das lipases produzidas. Acredita-se que o potencial de inovação desta pesquisa reside na produção e caracterização bioquímica de lipases por fungos filamentosos pouco estudados como o *Trichoderma koningii* e o *Penicillium sp.* F02, sendo esta última uma cepa isolada de resíduos gordurosos da região local (Vitória, ES). A realização da caracterização bioquímica das lipases de baixo custo pode vir a identificar biocatalisadores promissores para a síntese enzimática de biodiesel ou para outras aplicações industriais que podem fazer uso de lipases não purificadas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo investigar a produção enzimática e a caracterização bioquímica de lipases intracelulares e extracelulares produzidas por três espécies de fungos filamentosos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial de produção de lipases (intracelulares e extracelulares) de três fungos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Penicillium sp. F02* e *Trichoderma koningii*) via Fermentação Submersa (FS);
- Avaliar o efeito da concentração do substrato sobre a atividade lipásica e determinar a constante de Michaelis ( $K_m$ ) e a velocidade máxima de reação ( $V_{máx.}$ ) para as lipases produzidas;
- Avaliar o efeito de parâmetros físico-químicos (Temperatura e pH) sobre atividade lipásica das lipases produzidas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 LIPASES

##### 3.1.1 Definição

As lipases [triacilglicerol hidrolase, Enzyme Commission (E.C.) 3.1.1.3] são enzimas definidas como serino-hidrolases ou hidrolases de éster carboxílico e catalisam a hidrólise e/ou a síntese de acilgliceróis de cadeia longa (JAEGER, 2002; IUBMB, 2020b). Na Figura 1 são apresentadas as reações de hidrólise/síntese do triacilglicerol catalisadas por lipases.

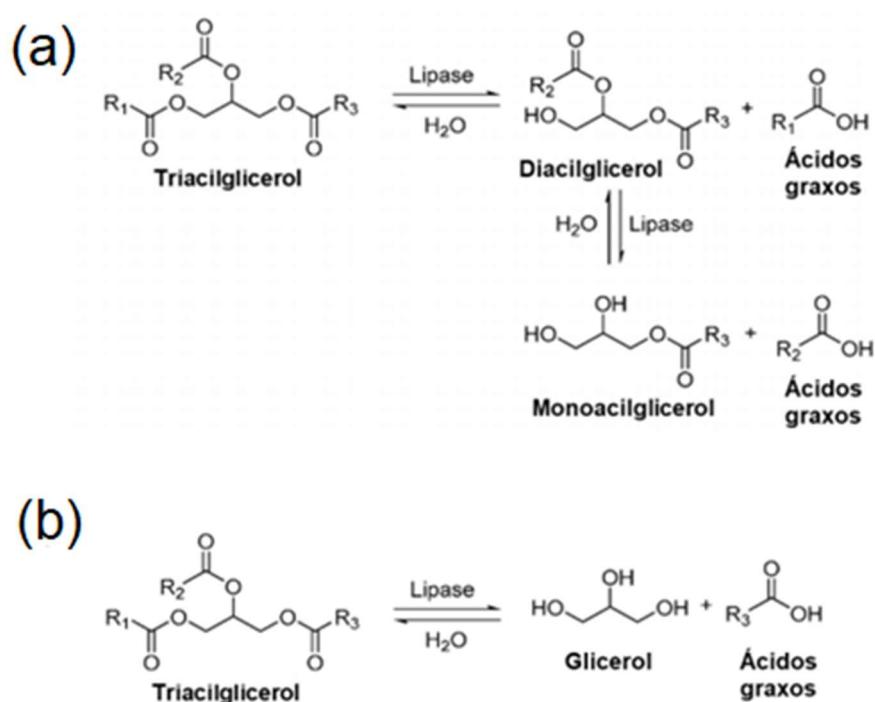


Figura 1 – Esquema do metabolismo do triacilglicerol pela enzima lipase. (a) atuação regiosseletiva e (b) atuação não-regiosseletiva  
Fonte: Adaptado de TACIN *et al.* (2019)

Em meio aquoso, as lipases são reconhecidas pela capacidade de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis com a liberação de ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol, atuando de forma regiosseletiva ou não, como apresentado na Figura 1 (TREICHEL *et al.*, 2010; TACIN *et al.*, 2019). No entanto, em condições termodinâmicas favoráveis (principalmente em baixa atividade termodinâmica de água) estas enzimas também são capazes de catalisar reações de esterificação, transesterificação, interesterificação,

aminólise e lactonização (FICKERS; MARTY; NICAUD, 2011; COLLA; REINEHR; COSTA, 2012).

As lipases funcionam na interface formada entre ambientes hidrofóbicos e aquosos (MALA; TAKEUCHI, 2008). Dessa forma as lipases, embora solúveis em água, catalisam reações envolvendo substratos lipídicos insolúveis em água. Esta capacidade é devida às características estruturais das lipases (VILLENEUVE et al., 2000). Em termos estruturais, as lipases são proteínas caracterizadas pela estrutura de dobramento  $\alpha/\beta$ -hidrolase e por uma tríade catalítica conservada composta pelos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico ou ácido glutâmico (CASAS-GODOY et al., 2018; CHENG et al., 2019).

A Figura 2 apresenta uma representação esquemática da estrutura de dobramento de uma  $\alpha/\beta$ -hidrolase. As setas azuis representam os  $\beta$ -filamentos (1 a 8), os cilindros vermelhos  $\alpha$ -hélices (A-F) e os círculos laranjas estão em posições relativas aos aminoácidos da tríade catalítica. A família de enzimas caracterizadas pelo dobramento  $\alpha/\beta$ -hidrolase é um dos maiores grupos de enzimas estruturalmente relacionadas, com uma ampla gama de funções catalíticas (RIEGLER-BERKET et al., 2018). A maioria das lipases possuem um núcleo central composto por uma folha  $\beta$ -central retorcida, formada por oito  $\beta$ -filamentos paralelos, e cercada por um número variado de  $\alpha$ -hélices (SARMAH et al., 2018), como é mostrado na Figura 2.

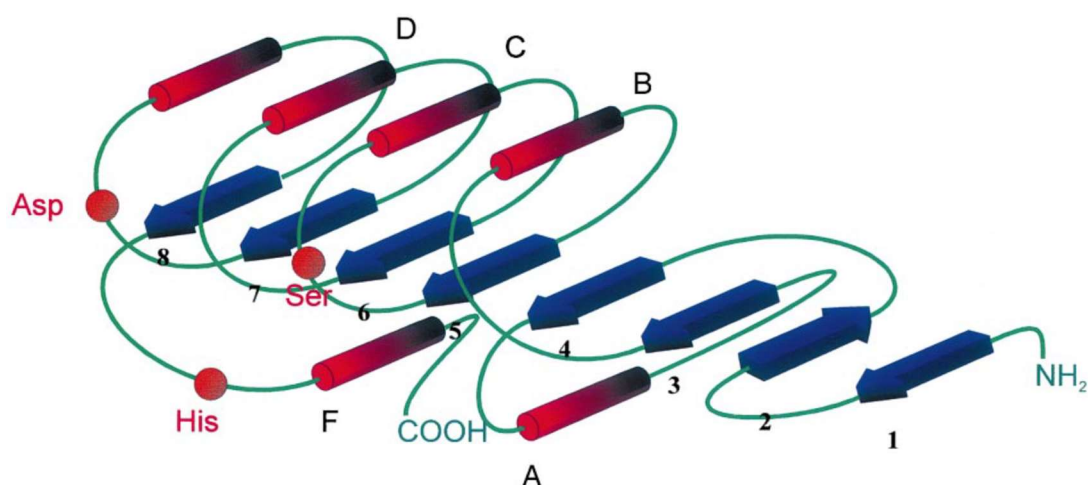


Figura 2 – Representação esquemática de uma  $\alpha/\beta$ -hidrolase  
Fonte: BORNSCHEUER (2002).

Os principais componentes estruturais da lipase incluem a tampa ou lid, sítio ativo, cavidade de oxianion e ligações dissulfeto (JAEGER; EGGERT, 2002). O sítio ativo está localizado na folha  $\beta$ -central e geralmente é um local de ligação hidrofóbico. A hidrólise do substrato é realizada através da formação de um intermediário tetraédrico, estabilizado através de interações com aminoácidos que compõem uma estrutura no formato de túnel (cavidade de oxianion) (SARMAH et al., 2018). Além disso, sabe-se que as lipases são ricas em cisteína e formam ligações dissulfeto para manter sua estrutura, uma vez que estas contribuem para a estabilidade da conformação. Na maioria das lipases uma ou duas  $\alpha$ -hélices curtas, na forma de laço, formam a chamada “tampa”, que cobre o sítio ativo da enzima. Seu papel é bloquear o sítio ativo, regulando a atividade de lipases em interfaces lipídio-água. Este mecanismo é chamado de ativação interfacial (FICKERS; MARTY; NICAUD, 2011).

### **3.1.2 Ativação Interfacial das lipases**

As lipases funcionam naturalmente na interface formada entre moléculas anfifílicas e o ambiente aquoso (WILLEMS et al., 2017). Esta propriedade característica das lipases é chamada de ativação interfacial, o que significa um aumento acentuado na atividade catalítica da lipase quando o substrato começa a formar uma emulsão em função da presença de substratos insolúveis (JAEGER et al., 1994).

Acredita-se que as interfaces hidrofóbicas podem induzir transições estruturais em lipases que resultam em um aumento na atividade enzimática, embora o mecanismo detalhado deste processo atualmente não seja bem compreendido para muitas lipases (WILLEMS et al., 2017). No nível molecular, o mecanismo de ativação interfacial das lipases é satisfatoriamente elucidado pela presença de uma tampa ou lid, que cobre o sítio ativo e o protege da exposição em ambiente aquoso e abre em contato com substratos micelares ou anfifílicos (ANGKAWIDJAJA et al., 2010).

A tampa é uma estrutura anfipática móvel, não observada em todas as lipases, e que cobre, principalmente, a região do sítio catalítico ativo, onde o comprimento e a complexidade desta estrutura dependem inteiramente da forma das lipases. De acordo com estudos sobre o tema é possível afirmar que a tampa

está envolvida fortemente na modulação da atividade e da seletividade do substrato nas lipases (YAACOB et al., 2019) e parece desempenhar um papel muito complexo na especificidade e estabilidade conformacional dessas enzimas (SECUNDO et al., 2006).

Estruturalmente, o lado interno da tampa, de frente para o sítio ativo, é hidrofóbico, enquanto o lado externo é hidrofílico. Em meio aquoso, a tampa cobre o sítio ativo da enzima. Na interface lipídio-água, a tampa anfipática das lipases sofre mudanças conformacionais e afasta-se do sítio ativo, transformando assim a forma inativa da enzima em uma forma ativa, com o sítio ativo acessível ao substrato (TANG et al., 2015).

A Figura 3 é uma representação esquemática do mecanismo de ativação interfacial proposto para a lipase M37 (semelhante àquele da *Thermomyces lanuginosus*) pela presença de trioleína. A seta azul indica a mudança entre as formas fechada (com o flap e a tríade catalítica cobertos pelo lid) e a forma aberta (mudança de posição do lid), sendo esta última caracterizada pela exposição das regiões hidrofóbicas da lipase e do flap (em roxo) ligado ao sítio ativo (mostrado em laranja).

Um estudo de 2018 demonstrou, com base em simulações computacionais, que as regiões centrais hidrofóbicas da lipase foram encontradas localizadas perto da entrada do sítio ativo, algo que determinou a convergência natural e a orientação da lipase para a interface óleo-água e proporcionou alcançar uma atividade enzimática aprimorada, com maior velocidade. Além disso, dentre as conclusões alcançadas observou-se que o ambiente anfifílico faz com que as regiões hidrofóbicas e a entrada do sítio ativo exponham mais a interface óleo-água, a fim de que os substratos não polares se liguem e ocorra a redução das interações de ligação de hidrogênio entre a lipase e a água. Isso contribui para uma menor hidratação da lipase e conduz a uma melhor manutenção da conformação aberta da tampa e a alta atividade da lipase (CHENG et al., 2018).

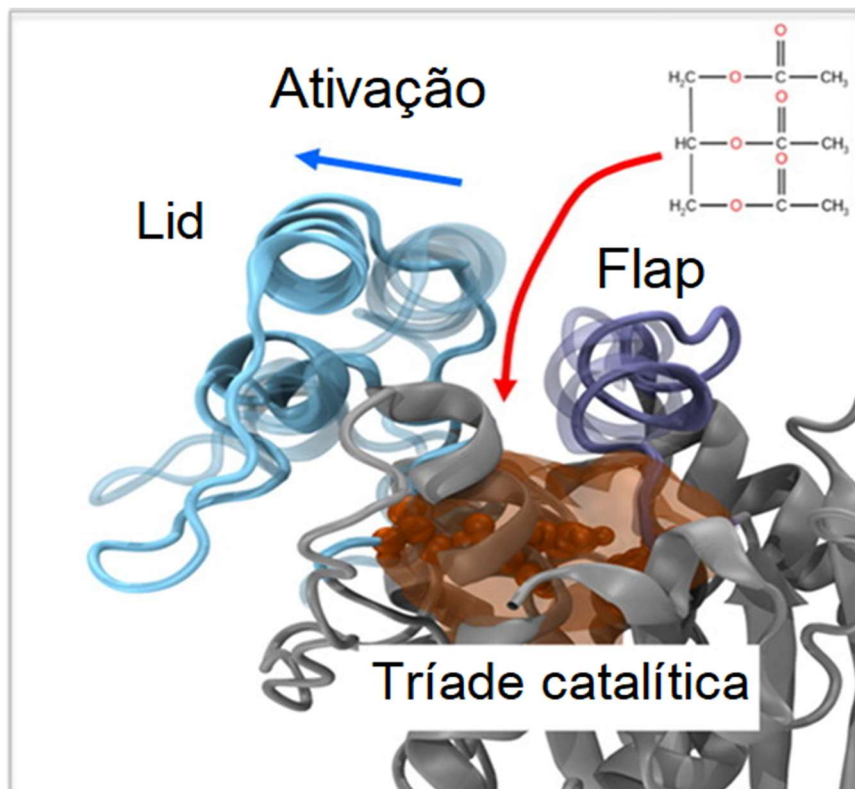


Figura 3 – Mecanismo proposto via simulação computacional para a ativação interfacial da lipase M37

Fonte: Adaptado a partir de WILLEMS et al. (2017).

A propriedade de catalisar a hidrólise de ésteres insolúveis distingue as lipases de outras esterases que, por sua vez, podem hidrolisar ésteres solúveis em água (SARMAH et al., 2018). Em oposição à maioria das enzimas as lipases exibem uma ampla especificidade, reconhecendo substratos diferentes. Nesse sentido, o uso industrial destas enzimas como biocatalisadores deve considerar o mecanismo de ativação interfacial das lipases (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010), considerando a possibilidade de aplicação das lipases como catalisador nas reações de hidrólise, esterificação, transesterificação e até na interesterificação de gorduras e óleos (MALA; TAKEUCHI, 2008).

### 3.1.3 Aplicações Industriais

As lipases são enzimas com considerável potencial industrial, considerando as suas propriedades únicas como a especificidade para uma ampla gama de substratos e excelentes estabilidade e seletividade, que as posicionam como as enzimas industriais mais amplamente utilizadas (LI; ZONG, 2010; SARMAH et

al., 2018). Dentre essas propriedades destaca-se a versatilidade das lipases como catalisador em inúmeras reações relevantes e isso despertou o interesse para aplicações em muitas indústrias (SHABBIR; MUKHTAR, 2018; GONÇALVES FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019).

As lipases são comumente usadas como biocatalisador na síntese de biodiesel, em laticínios e indústrias químicas (MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2019). Além das aplicações convencionais, as lipases possuem uma miríade de potenciais aplicações industriais, como na formulação de detergentes e de cosméticos, na síntese orgânica e em indústrias farmacêuticas, no beneficiamento de couro, desenvolvimento de flavors e fragrâncias, formulação de emulsionantes, produção de ácidos graxos e indústrias de papel, processamento de óleo e processamento de alimentos (GUERRAND, 2017; JAVEDA et al., 2018; SARMAH et al., 2018; MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2019). Considerando as vastas aplicações biotecnológicas das lipases é sabido que existe uma demanda crescente para a pesquisa e produção de lipases a fim de suprir as necessidades da indústria (SARMAH et al., 2018).

### 3.2 PRODUÇÃO DE LIPASES

As lipases são enzimas com funções biológicas relevantes na natureza e podem ser produzidas por várias plantas, animais e microrganismos. As lipases de origem microbiana são produzidas em nível industrial e representam a classe mais utilizada de enzimas em processos biotecnológicos e química orgânica (TREICHEL et al., 2010; JAVEDA et al., 2018). Acredita-se que enzimas microbianas contribuem com 90% do mercado global de lipases (GUERRAND, 2017). O uso preferencial de enzimas microbianas em relação as plantas ou animais é justificado devido as várias vantagens apresentadas, como a facilidade de produção e otimização, produção mais econômica e consistente atividade catalítica e estabilidade (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2016; RAVEENDRAN et al., 2018).

As lipases microbianas podem ser produzidas via processos de Fermentação Submersa (FS) ou Fermentação em Estado Sólido (FES). A FS envolve o cultivo de microrganismos em meios líquidos concentrados em oxigênio e nutrientes,



enquanto a FES é adequada para a produção de enzimas usando substratos naturais, como resíduos agrícolas, com pouca ou nenhuma água livre disponível (LIU; KOKARE, 2017). A FS tem mostrado algumas vantagens, tais como maior homogeneidade do meio de cultivo e maior facilidade para controlar parâmetros variáveis, como temperatura e pH (PANDEY et al., 2000). Hölker e Höfer (2004) afirmam que o uso industrial da FES encontra problemas com a reprodutibilidade dos experimentos de aumento de escala pela formação de gradientes (temperatura, aeração, pH e umidade) no meio de cultivo sólido.

Para Treichel et al. (2010), embora sejam numerosos os fatores que influenciam a produção de lipases microbianas em um meio de cultivo, tem destaque a presença de um indutor, particularmente óleo, bem como fontes de nitrogênio e parâmetros operacionais apropriados, como o pH, temperatura, agitação e níveis de oxigênio.

Dentre os microrganismos produtores de lipases destacam-se as bactérias, leveduras e fungos filamentosos (RAMOS-SÁNCHEZ et al., 2015; MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2019). Conforme Geoffry e Achur (2018), a utilidade de fungos (leveduras e fungos filamentosos) para a produção de lipases tem sido destacada pela atividade catalítica consistente e maior estabilidade relativa às lipases de origem bacteriana.

### 3.3 PRODUÇÃO DE LIPASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos filamentosos são microrganismos eucariontes, aeróbios, terrestres e tem sido usados como fábricas de células versáteis e altamente produtivas por mais de um século (STÜBINGER et al., 2016; STEINBERG et al., 2017). Eles são usados para produzir enzimas e biomoléculas, como antibióticos e ácidos orgânicos (WÖSTEN, 2019).

Entre as enzimas produzidas por fungos filamentosos as lipases são consideradas biocatalisadores excepcionais. O benefício principal destas enzimas, em geral, é que estas são simplesmente aquiescentes à separação por causa de sua natureza extracelular, o que diminui consideravelmente o custo total de obtenção e faz estas lipases mais interessantes do que lipases

bacterianas para operações em grande escala (SHARMA; SHARMA; SAXENA, 2016; MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2019).

Alguns dos fungos produtores de lipase mais importantes comercialmente são reconhecidos como pertencentes aos gêneros *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.* e *Rhizomucor sp.* (TREICHEL et al., 2010). Os gêneros de fungos filamentosos acima descritos podem ser isolados do solo, fezes de animais, frutas e plantas (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017) e são amplamente descritos na literatura como potenciais produtores de lipases.

### **3.3.1 Lipases produzidas por *Penicillium sp.***

O gênero *Penicillium* está entre os mais produtivos de todos os fungos filamentosos, produzindo uma ampla gama de metabólitos secundários (FRISVAD, 2015). Muitas espécies de *Penicillium* são consideradas fábricas de enzimas e reconhecidas, principalmente, pela produção de celulases e lipases (VISAGIE et al., 2014).

DHEEMAN et al. (2011) identificaram uma cepa fúngica como *Penicillium sp. DS-39* e via FS produziram uma lipase extracelular, induzida quando cultivada em um meio contendo 1,0% (v/v) de azeite de oliva. A atividade máxima de lipase [3,25 UI/mL para palmitato de p-nitrofenila (p-NPP) foi obtida após 120 h de incubação, à 28 °C]. A lipase produzida mostrou uma alta estabilidade térmica e estabilidade na presença de solventes hidrofóbicos não polares. Conforme os autores essas características tornam as lipases de *Penicillium sp. DS-39* um potencial biocatalisador para aplicações como produção de biodiesel e biodegradação de óleo no meio ambiente.

LIMA et al. (2019b) investigaram o fungo filamentoso *Penicillium citrinum* URM 4216 como um potencial produtor de lipase ligada ao micélio sob cultivo submerso, usando azeite de oliva como indutor. O azeite de oliva e a peptona de soja foram considerados as melhores fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente e promoveram a melhora da atividade lipásica intracelular. Os autores concluíram que a produção de lipase não foi influenciada pelo crescimento celular. Além disso, observou-se uma diminuição da atividade lipásica quando a concentração de peptona de soja foi reduzida, mantendo as

demais condições de estudo constantes. Isso pode sugerir que a concentração da fonte de nitrogênio exerce influência na atividade lipásica.

MENONCIN et al. (2008) realizaram a produção de lipases via FES e empregaram o fungo filamentoso *Penicillium verrucosum*, anteriormente isolado a partir de resíduos industriais de óleo de babaçu. Um dos objetivos deste estudo foi avaliar a caracterização parcial das lipases no caldo fermentado. Observa-se que atividades de lipase mais altas (cerca de 4 U/ml para azeite de oliva) foram obtidas na temperatura e pH de 37 °C e 7,0, respectivamente, e a atividade lipásica mostrou-se praticamente a mesma do valor inicial após 91 dias de armazenamento.

MAROTTI et al. (2017) realizaram um trabalho experimental direcionado à seleção das espécies do gênero *Penicillium* com maior potencial de produzir lipases ligadas ao micélio na forma livre. De forma geral, todos os fungos apresentaram crescimento regular ao final de 72 h, nas condições de cultivo utilizadas (FS, 28°C, 200 rpm, azeite de oliva). Usando azeite de oliva como indutor, observou-se que três espécies (*Penicillium italicum* AT4421, *Penicillium janthinellum* CCT3162 e *Penicillium purpurogenum* AT2008) foram capazes de produzir lipases com elevadas atividades lipásicas (maiores que 150 U por grama de células secas). Com base nos resultados obtidos para as espécies do gênero *Penicillium*, os autores os descreveram como fontes promissoras de lipases ligadas ao micélio e acreditam que as enzimas produzidas podem ser aplicadas em reações de hidrólise de óleos vegetais saturados ou insaturados.

### **3.3.2 Lipases produzidas por *Aspergillus* sp.**

O gênero *Aspergillus* é um dos fungos filamentosos mais utilizados comercialmente. É um gênero comum e difundido nos mais diversos habitats do planeta e por isso, são capazes de processar substratos diversos e complexos, bem como competir com uma grande variedade de outros microrganismos (BENNET, 2007; TROIANO; ORSAT; DUMONT, 2020). Cepas de *Aspergillus* são microrganismos amplamente utilizados devido à sua capacidade de produzir enzimas extracelulares e por serem reconhecidas como “Geralmente Reconhecido como Seguro” (GRAS, sigla em inglês) pela agência regulatória

americana Food and Drug Administration (FDA) (TROIANO; ORSAT; DUMONT, 2020).

COLLA et al. (2015) estudaram a produção de lipases extracelulares pelo gênero *Aspergillus* via FS e concluíram que as enzimas produzidas por fermentação submersa foram mais estáveis termicamente do que as lipases obtidas por FES. A máxima atividade lipásica obtida via FS no extrato enzimático bruto foi igual a 4,4 U/ml (para azeite de oliva) e a lipase mostrou atividade residual de 72% após 1 h de exposição a temperaturas de 70 a 90 °C. A lipase produzida via FES apresentou atividade lipásica máxima igual 42,8 U/g (de substrato) e 26,8% de atividade residual após 1 h de exposição à 60 °C.

COLLA et al. (2016) avaliaram a influência de nove fatores (fonte de carbono, tipo de farelo, fonte de nitrogênio, concentração da fonte de nitrogênio, indutor, concentração de indutores, espécie de fungo, pH e agitação) na produção de lipases via FS. Os fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* foram selecionados como bons produtores e dentre os fatores estudados somente a concentração da fonte de nitrogênio (extrato de levedura) e o pH foram considerados como fatores estatisticamente significativos.

ROMERO et al. (2007) obtiveram um aumento de 97% na atividade lipásica intracelular (células íntegras com atividade lipásica) de *Aspergillus niger* MYA 135 com a suplementação do meio de cultivo submerso com 2% de azeite de oliva. A atividade máxima encontrada foi igual a 40,0 U/g (de células secas) em 96 horas de fermentação. LIU et al. (2010) obtiveram uma atividade de 43,8 U/g (de células secas) em 72 h de cultivo submerso, com lipases de células íntegras do microrganismo *Saccharomyce cereviase* modificado geneticamente para expressar as lipases de *Aspergillus niger* em sua superfície.

LIMA et al. (2019a) avaliaram os efeitos das variáveis no processo de produção de lipases extracelulares produzidas por *Aspergillus niger* C via FS. Os ensaios de produção foram realizados em frascos Erlenmeyer por 72 horas, à 150 rpm e 32 °C. A determinação da atividade lipase no extrato de enzima bruta foi realizada utilizando-se o método titrimétrico e a maior atividade lipásica (13,12 U/ml para azeite de oliva) foi encontrada nas condições centrais do planejamento

(15,0 g/l de sacarose, 4,0 g/l de sulfato de amônio, 4,0 g/l de óleo de soja, 1,0 g/l de extrato de levedura e pH 7,0).

### 3.3.3 Lipases produzidas por *Trichoderma sp.*

O gênero *Trichoderma* é composto por espécies de habitantes do solo encontradas em todo o mundo, em material celulósico em decomposição ou na rizosfera de plantas. Este gênero de fungo filamentosos é caracterizado pelo rápido crescimento em diversos substratos e pela colonização bem-sucedida de diversos habitats (HARMAN et al., 2004; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010).

CORADI et al. (2013) avaliaram de forma simultânea a produção de lipase por *Trichoderma harzianum* via FS e via FES com resíduos agroindustriais. As culturas em FS apresentaram a maior atividade lipásica de todos os ensaios (1,4 U/ml para azeite de oliva), contendo extrato de levedura (0,5 % m/v) e azeite de oliva (1% v/v). Nas condições estudadas, a maior atividade lipásica foi obtida em FS, enquanto a maior atividade lipásica específica por grama de óleo foi obtida com FES. De acordo com os autores os resultados apresentados são promissores porque demonstraram uma enzima com propriedades interessantes (estabilidade em metanol, estabilidade em pH levemente ácido e manutenção de 50% da atividade lipásica após 30 min à 50 °C) para aplicação em catálise.

MARQUES et al. (2014) estudaram a produção de lipases extracelulares por *Trichoderma atroviride* 676. As culturas foram incubadas durante 120 h, 120 rpm e 28 °C, em meio líquido contendo azeite de oliva. A otimização dos níveis de temperatura, pH e taxa de agitação resultou na produção máxima de enzimas de 175,20 U/ml. Segundo os autores, considerando as propriedades gerais da lipase estudada (lipase alcalina com adaptabilidade a baixas temperaturas e forte tolerância a surfactantes) a enzima obtida tem potencial para ser empregada em diferentes aplicações biotecnológicas, como a síntese de solventes orgânicos e a formulações de detergentes.

ÜLKER et al. (2011) isolaram de amostras de solo um fungo filamento identificado como *Trichoderma harzianum* IDM14D. A cepa isolada foi cultivada para a produção de lipase em frascos à 30°C e durante 7 dias. Foi determinado que a melhor fonte de carbono foi a glicose e a melhor fonte de nitrogênio foi a peptona, visto pelo melhor crescimento da biomassa. A biomassa máxima foi

produzida com concentração de 1,25 g/l em 7 dias. A atividade máxima de lipase foi determinada como 0,24 U/ml no 7º dia de incubação em um meio suplementado com glicose e peptona.

A produção de lipases por *Trichoderma koningii* via FS com efluentes de laticínios como meio de cultura já foi investigada por MARQUES (2013). Mostrou-se um aumento na atividade lipásica (11 U/ml para 1327 U/ml) quando o meio de cultura foi suplementado com azeite de oliva, Tween 80 e meio de Vogel. O trabalho supracitado demonstrou a possibilidade de aplicação do efluente de laticínio como a principal fonte de carbono para o cultivo submerso de *T. koningii*, com vistas a obtenção de lipases e outras biomoléculas de custo reduzido. As lipases obtidas, segundo o autor, possuem características desejáveis para serem empregadas no pré-tratamento dos efluentes gordurosos gerados em laticínios, o que pode reduzir o custo global do processo de tratamento desses efluentes.

### 3.4 LIPASES LIGADAS AO MICÉLIO

Os processos industriais exigem enzimas com especificidades únicas e alto desempenho e isso atrai a atenção de pesquisadores para produzir novas enzimas para minimizar o custo. Embora muitas lipases microbianas tenham sido exploradas por seu modo de atuação, o alto custo de produção e purificação dificulta sua comercialização mundial (PRIJI et al., 2016). Considerando isso, um processo atraente é o uso de lipases ligadas ao micélio (MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2019).

O uso de lipases ligadas ao micélio é potencialmente rentável porque a biomassa pode ser utilizada diretamente nos processos de biotransformação. Isso permite a eliminação de procedimentos complexos de isolamento enzimático, purificação e imobilização, o que muitas vezes resulta na perda de sua atividade (LIMA et al., 2019). Além disso, a estrutura celular pode atuar como uma matriz natural capaz de proteger as enzimas da possível ação negativa de agentes externos, proporcionando um efeito análogo ao exercido pela matriz utilizada para imobilização enzimática (ROMERO et al., 2007).

O uso de biomassa fúngica com atividade lipásica como biocatalisador representa uma atraente abordagem para o tratamento de águas residuais oleosas e produção de biodiesel, a partir de óleos e graxas residuais, devido à sua maior estabilidade, menor perda relativa de atividade, possibilidade de reuso e baixo custo (RODRIGUES et al., 2016). Nas últimas décadas, as lipases de fungos filamentosos ligadas ao micélio têm sido extensivamente estudadas como um biocatalisador alternativo nos processos de biotransformação e acredita-se que o uso desse tipo de biocatalisador, que pode ser usada diretamente como células livres suspensas ou imobilizadas dentro da biomassa, pode reduzir consideravelmente os custos globais de um processo enzimático (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017).

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LIPASES

A enorme potencialidade de aplicação das lipases e as características diferenciadas destas enzimas, que são variáveis entre microrganismos e mesmo entre espécies, motivam os estudos de caracterização bioquímica das lipases produzidas. A caracterização bioquímica de lipases envolve uma gama de ensaios que vêm a identificar potenciais biocatalisadores, considerando que a atividade enzimática é influenciada por fatores como a concentração da enzima, concentração de substrato e sua disponibilidade, inibidores e ainda pH e temperatura (MAROTTI et al., 2017).

Os ensaios mais comumente descritos na literatura para lipases são aqueles que visam determinar parâmetros cinéticos, como a constante de Michaelis ( $K_m$ ) e a velocidade máxima de reação ( $V_{máx.}$ ) para um substrato específico, ensaios de determinação de pH e temperatura ótimos de atuação e ensaios de determinação de estabilidade térmica, com a avaliação de parâmetros como a constante de desativação térmica ( $K_d$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ). Os parâmetros bioquímicos citados são fundamentais para avaliar e orientar a aplicação das lipases em potenciais processos de biocatálise. Nas Tabelas 1, 2 e 3 são mostrados resultados de ensaios de caracterização bioquímica de lipases produzidas pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* encontrados na literatura recente.

Tabela 1 – pH e Temperatura ótimos para lipases produzidas pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* descritos na literatura (2010 – atual)

| <b>Microrganismo</b>                         | <b>Método de Atividade</b> | <b>pH ótimo</b> | <b>Temperatura ótima</b> | <b>Referência</b>        |
|--|----------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> (ATCC 1015)         | Titrimétrico               | 7,0             | 45°C                     | Osho, Akpan e Adio, 2015 |
| <i>Aspergillus niger</i> (IOC 3677)          | Titrimétrico               | 5,0             | 55°C                     | Santos et al., 2017      |
| <i>Aspergillus niger</i>                     | Titrimétrico               | 4,0             | 37°C                     | Santos et al., 2014      |
| <i>Aspergillus niger</i> (MYA 135)           | Colorimétrico              | 7,0             | 37°C                     | Romero et al., 2012      |
| <i>Aspergillus niger</i> (NICM 1207)         | Titrimétrico               | 2,5             | 40°C.                    | Zhang et al., 2019       |
| <i>Aspergillus niger</i> C                   | Titrimétrico               | 5,0 a 6,0       | 55°C                     | Lima et al., 2019a       |
| <i>Penicillium verrucosum</i>                | Titrimétrico               | 8,5             | 42 °C                    | Menoncim et al., 2010    |
| <i>Penicillium purpurogenum</i> (AT2008)     | Titrimétrico               | 7,0             | 40 a 45°C                | Marotti et al., 2017     |
| <i>Penicillium citrinum</i> (URM 4216)       | Titrimétrico               | 8,0             | 45°C                     | Lima et al., 2019b       |
| <i>Penicillium italicum</i> (AT4421)         | Titrimétrico               | 7,0             | 40°C                     | Marotti et al., 2017     |
| <i>Penicillium janthinellum</i> (CCT3162)    | Titrimétrico               | 7,0             | 40 a 45°C                | Marotti et al., 2017     |
| <i>Trichoderma atroviride</i> 676 (IOC 4503) | Colorimétrico              | 8,0             | 35°C                     | Marques et al., 2014     |
| <i>Trichoderma lentiforme</i> (ACCC30425)    | Titrimétrico               | 9,5             | 50°C                     | Wang et al., 2018        |
| <i>Trichoderma reesei</i>                    | Titrimétrico               | 9,5             | 60°C                     | Zhang, 2015              |



Tabela 2 – Parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x.}$ ) de lipases produzidas pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* descritos na literatura (2010 – atual)

| <b>Microrganismo</b>                      | <b>Substrato</b> | <b><math>K_m</math></b> | <b><math>V_{m\acute{a}x.}</math></b> | <b>Referência</b>    |
|---|------------------|-------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> (AN0512)         | p-NPB*           | 0,094mM                 | 0,5 mM/min                           | Liu et al., 2015     |
| <i>Aspergillus niger</i> (imobilizada)    | Azeite de Oliva  | 170mM                   | 0,0216 mM/min                        | Santos et al., 2014  |
| <i>Aspergillus niger</i> (livre)          | Azeite de Oliva  | 117mM                   | 0,0276 mM/min                        | Santos et al., 2014  |
| <i>Aspergillus niger</i> (imobilizada)    | Azeite de Oliva  | 115mM                   | 714 U/mg                             | Santos et al., 2017  |
| <i>Aspergillus niger</i> (livre)          | Azeite de Oliva  | 77mM                    | 1250 U/mg                            | Santos et al., 2017  |
| <i>Aspergillus niger</i> MYA 135          | p-NPP**          | 2,81mM                  | 0,025 $\mu$ mol/(mL.min)             | Romero et al., 2012  |
| <i>Penicillium purpurogenum</i> (AT2008)  | Azeite de Oliva  | 141,4mM                 | 493,8 $\mu$ mol/min                  | Marotti et al., 2017 |
| <i>Penicillium citrinum</i> URM 4216      | Óleo de soja     | 136,51 $\mu$ M          | 267,33 $\mu$ mol/(g.min)             | Lima et al., 2019b   |
| <i>Penicillium italicum</i> (AT4421)      | Azeite de Oliva  | 151,3mM                 | 539,1 $\mu$ mol/min                  | Marotti et al., 2017 |
| <i>Penicillium janthinellum</i> (CCT3162) | Azeite de Oliva  | 123,6mM                 | 387,6 $\mu$ mol/min                  | Marotti et al., 2017 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> (IDM14D)     | p-NPB            | 7,15mM                  | 7,067 mM/min                         | Ülker et al., 2010   |
| <i>Trichoderma lentiforme</i> (ACCC30425) | p-NPB            | 0,40mM                  | 12,2 $\mu$ mol/(min.mg)              | Wang et al., 2018    |
| <i>Trichoderma harzianum</i>              | p-NPP            | 0,6535mM                | 1,892 U/ml                           | Coradi et al., 2013  |

\*p-NPB = butirato de p-nitrofenila, \*\*p-NPP = palmitato de p-nitrofenila, M = mol/l

Tabela 3 – Parâmetros de estabilidade térmica ( $K_d$  e  $t_{1/2}$ ) de lipases produzidas pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* na literatura (2010 – atual)

| <b>Microrganismo</b>                      | <b><math>K_d</math></b>    | <b><math>t_{1/2}</math></b> | <b>Referência</b>    |
|---|----------------------------|-----------------------------|----------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> (imobilizada)    | 0,014 1/h                  | 48,51h à 37 °C              | Santos et al., 2014  |
| <i>Aspergillus niger</i> (livre)          | 0,1 1/h                    | 6,93 h à 37 °C              | Santos et al., 2014  |
| <i>Aspergillus niger</i> (imobilizada)    | 0,01 1/h                   | 63 h à 55 °C                | Santos et al., 2017  |
| <i>Aspergillus niger</i> (livre)          | 0,02 1/h                   | 35 h à 55 °C                | Santos et al., 2017  |
| <i>Penicillium purpurogenum</i> (AT2008)  | 1,17 1/h                   | 1,21h à 50 °C               | Marotti et al., 2017 |
| <i>Penicillium citrinum</i> (URM 4216)    | 1,06. 10 <sup>-4</sup> 1/h | 1,8 h à 60 °C               | Lima et al., 2019a   |
| <i>Penicillium italicum</i> (AT4421)      | 0,76 1/h                   | 0,92 h à 50 °C              | Marotti et al., 2017 |
| <i>Penicillium janthinellum</i> (CCT3162) | 0,62 1/h                   | 0,57 h à 50 °C              | Marotti et al., 2017 |

Nota-se na Tabela 1 um predomínio de pesquisas envolvendo lipases de *A. niger*, mesmo sendo estudos que avaliaram diferentes cepas fúngicas. Tal constatação se repetiu nas Tabelas 2 e 3. Isso pode ser explicado pelo fato de as lipases serem muito requisitadas na indústria de alimentos e bebidas, e as lipases de *A. niger* serem geralmente classificadas como GRAS pelo FDA. Nota-se ainda uma lacuna de pesquisas com as lipases produzidas pelo gênero *Trichoderma*, e no caso da Tabela 3, não foram encontrados trabalhos publicados acerca da determinação dos parâmetros de estabilidade térmica de lipases produzidas pelo gênero *Trichoderma*. Especificamente, em relação a espécie *T. koningii* acredita-se que esta última possui um potencial de produção de lipases de baixo custo e com características desejáveis a ser explorado no futuro, tendo em vista o trabalho realizado por MARQUES (2013).

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA**

#### **4.1.1 Microrganismos e obtenção do inóculo**

O fungo filamentoso *Penicillium sp.* F02 foi isolado a partir da espuma de caixa de gordura e foi providenciado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Saneamento do Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo (LABSAN/DEA/UFES). Os microrganismos *Aspergillus niger* (Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde – INCQS 40018) e o *Trichoderma koningii* INCQS 40331 foram obtidos da Fundação Oswaldo Cruz. Todas as cepas fúngicas foram mantidas em meio Potato Dextrose Agar (PDA) comercial e armazenados em geladeira à 4°C.

Para obtenção do inóculo, os microrganismos foram cultivados em placas de Petri com meio PDA (4,2% m/v), à temperatura de 28°C, durante cinco dias em estufa de crescimento biológico. Ao final do cultivo, os esporos foram raspados em 10 ml de solução de Tween80 (0,1% v/v) e contados em câmara de Neubauer para determinação da sua concentração e assim mensurar o volume do inóculo (LIMA; SILVA; PINOTTI, 2014).

#### **4.1.2 Meio de cultivo**

A metodologia empregada para a produção de lipases via fermentação submersa para os três microrganismos estudados foi adaptada a partir de Lima, Silva e Pinotti (2014) e Marotti et al. (2017). O meio líquido foi composto por peptona bacteriológica (3% m/v), extrato de levedura (0,5% m/v), NaCl (0,5% m/v), azeite de oliva comercial (30 g/l) com baixo teor de acidez, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1% m/v) e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,05% m/v). Peptona e extrato de levedura foram adquiridos da Himedia® (Índia) e os demais reagentes empregados foram de grau analítico.

#### **4.1.3 Produção enzimática via Fermentação Submersa**

A produção enzimática via FS foi realizada utilizando o meio descrito em 4.1.2, com os fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* e *Trichoderma koningii*. Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 ml,

contendo 100 ml do meio de cultivo líquido. Os frascos foram autoclavados (121°C/20 minutos) e posteriormente manipulados em fluxo laminar para adição do inóculo, de forma que a concentração final de esporos foi ajustada para 10<sup>6</sup> esporos/ml. A temperatura de cultivo foi mantida à 28°C. Os ensaios foram realizados em incubadora shaker de agitação orbital à 200 rpm, com controle de temperatura, durante 96 horas de fermentação.

Após a fermentação, os meios de cultivo foram filtrados à vácuo utilizando filtro de papel 80 g/m<sup>2</sup> (Whatman, UK) e o micélio retido na membrana foi lavado com acetona pura para remover o azeite residual. O teor de umidade do micélio foi aferido diretamente em uma balança de determinação de umidade (Web Labor, SP, Modelo 160G i-Thermo 163L), acoplada a uma lâmpada de infravermelho, à 75°C. O micélio e o caldo fermentado (extrato enzimático bruto) foram avaliados na determinação da atividade enzimática, que será expressa em função da quantidade de micélio seco (em g) para a atividade intracelular ou da quantidade de caldo fermentado (em ml) para a atividade extracelular.

#### **4.1.4 Determinação da atividade lipásica**

As atividades das lipases intracelulares (micélio) e das lipases extracelulares (caldo fermentado) foram realizadas conforme metodologia proposta por Marotti et al. (2017), pelo método de hidrólise do azeite de oliva. O substrato foi preparado pela emulsão de 10 ml de azeite de oliva e 90 ml de solução aquosa de goma arábica em pó pura (3% m/v). Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5 ml de substrato, 4 ml de solução tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e 0,3 g de biomassa fúngica (base úmida) ou 0,5 ml de caldo fermentado. Os frascos foram incubados à 37 °C por 15 minutos em incubadora shaker de agitação orbital igual à 100 rpm.

Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 ml de uma solução de acetona e etanol absoluto (1:1, v/v). Os ácidos graxos livres foram titulados com solução padrão de KOH 0,020M, usando fenolftaleína como indicador. Os cálculos de atividade lipásica foram efetuados pelas Equações 1 e 2 e uma unidade de lipase (UI) será definida como a quantidade de enzima (biomassa seca ou caldo fermentado) que libera 1 µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. A atividade lipásica foi expressa em

$\mu\text{moles/ (g.min)}$  ou  $\mu\text{moles/ (ml.min)}$  e os ensaios foram realizados em duplicata. As atividades específicas foram calculadas como sendo a razão entre a atividade lipásica, em unidades de lipase (UI), e as quantidades correspondentes de micélio seco, em g (base seca).

$$\textit{Atividade lipásica intracelular} = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot b} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\textit{Atividade lipásica extracelular} = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot c} \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que:

$V_a$  = volume de KOH gasto na titulação da amostra (ml);  $V_b$  = volume do KOH gasto na titulação do branco (ml);  $M$  = concentração molar da solução de KOH (M);  $t$  = tempo de reação (min);  $b$  = massa de biomassa seca (g) e  $c$  = volume de caldo fermentado (ml).

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PARAMÊTROS BIOQUÍMICOS DAS LIPASES PRODUZIDAS

A determinação de propriedades cinéticas das lipases intracelulares e extracelulares foi realizada conforme metodologia proposta por Marotti et al. (2017). Para determinar a constante de Michaelis ( $K_m$ ) e a velocidade máxima de reação ( $V_{m\acute{a}x.}$ ) foram preparados meios emulsificados (goma arábica e azeite de oliva comercial) contendo concentrações crescentes de azeite de oliva na faixa de 93 a 1116mM. As atividades lipásicas para as lipases produzidas foram determinadas e os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x.}$  foram obtidos pelo método gráfico de Lineweaver-Burk. A eficiência catalítica foi determinada como a razão entre o  $V_{m\acute{a}x.}$  e o  $K_m$  (CARVALHO et al., 2010).

Os ensaios para avaliar os efeitos dos parâmetros físicos-químicos (Temperatura e pH) sobre a atividade lipásica (variável resposta) das lipases intracelulares e extracelulares do *T. koningii* foram realizados conforme um planejamento experimental fatorial completo do tipo  $3^2$  (três níveis e dois fatores), acrescido de três repetições no ponto central. Dessa forma, foram realizados 11 experimentos para cada forma de lipase estudada. O *T. koningii* foi escolhido em função do pequeno número de estudos de caracterização bioquímica de suas

lipases na literatura. Os resultados dos ensaios foram analisados utilizando-se o *Statistica*® versão trial 14.0 (StatSoft Inc., USA), e os valores foram considerados significativos quando o p-valor < 0,10.

Os níveis das variáveis estudadas seguem apresentados na Tabela 4. A matriz do planejamento experimental contendo os valores em unidades codificadas e os valores em unidades originais das variáveis dos ensaios bem como as respostas esperadas (atividades lipásicas) pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 4 – Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental completo 3<sup>2</sup> para avaliação do efeito da temperatura e do pH sobre a atividade lipásica

| Níveis | Temperatura (°C) | pH  |
|--------|------------------|-----|
| -1     | 30               | 6,0 |
| 0*     | 37               | 7,0 |
| +1     | 44               | 8,0 |

\*Ponto Central

Tabela 5 – Matriz do planejamento experimental com valores codificados e valores em unidades reais dos fatores (Temperatura e pH) e as respectivas respostas (atividades lipásicas)

| Atividade Lipásica |                  |          |  |   |
|--------------------|------------------|----------|--|---|
| Ensaio n°          | Temperatura (°C) | pH       | Atividade lipásica intracelular (UI/g) | Atividade lipásica extracelular (UI/mL) |
| 1                  | -1 (30)          | -1 (6,0) | AI <sub>1</sub> *                      | AE <sub>1</sub> **                      |
| 2                  | 0 (37)           | -1 (6,0) | AI <sub>2</sub>                        | AE <sub>2</sub>                         |
| 3                  | +1 (44)          | -1 (6,0) | AI <sub>3</sub>                        | AE <sub>3</sub>                         |
| 4                  | -1 (30)          | 0 (7,0)  | AI <sub>4</sub>                        | AE <sub>4</sub>                         |
| 5                  | 0 (37)           | 0 (7,0)  | AI <sub>5</sub>                        | AE <sub>5</sub>                         |
| 6                  | +1 (44)          | 0 (7,0)  | AI <sub>6</sub>                        | AE <sub>6</sub>                         |
| 7                  | -1 (30)          | +1 (8,0) | AI <sub>7</sub>                        | AE <sub>7</sub>                         |
| 8                  | 0 (37)           | +1 (8,0) | AI <sub>8</sub>                        | AE <sub>8</sub>                         |
| 9                  | +1 (44)          | +1 (8,0) | AI <sub>9</sub>                        | AE <sub>9</sub>                         |
| 10                 | 0 (37)           | 0 (7,0)  | AI <sub>10</sub>                       | AE <sub>10</sub>                        |
| 11                 | 0 (37)           | 0 (7,0)  | AI <sub>11</sub>                       | AE <sub>11</sub>                        |

\*AI = Atividade lipásica intracelular, \*\*AE = Atividade lipásica extracelular

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Na Tabela 6 observa-se as atividades lipásicas intracelulares para os fungos filamentosos estudados nas condições referidas de cultivo submerso (28 °C, 200 rpm e 96 h de incubação).

Tabela 6 – Atividade lipásica intracelular determinada para os microrganismos estudados sob cultivo submerso

| Tempo de fermentação<br>(h) | Atividade Intracelular (UI/g de micélio seco) |                             |                        |
|-----------------------------|---|-----------------------------|------------------------|
|                             | <i>Aspergillus niger</i>                      | <i>Trichoderma koningii</i> | <i>Penicillium sp.</i> |
| 0                           | ND*   | ND*                         | ND*                    |
| 24                          | 9,4   | 42,9                        | 7,8                    |
| 48                          | 23,7  | 44,8                        | 19,3                   |
| 72                          | 31,4  | 69,8                        | 26,2                   |
| 96                          | 71,6  | 81,5                        | 40,9                   |

\*ND = Não determinado

Nota-se na Tabela 6 que os maiores valores de atividade intracelular observados foram obtidos no tempo de fermentação de 96 horas. A atividade intracelular máxima (81,5 UI/g) dentre todos os ensaios foi observada para o *T. koningii*. Nota-se que os valores máximos de atividade intracelular obtidos para o *T. koningii* e para o *A. niger* (71,6 UI/g) apresentam-se igualmente elevados, indicando a potencialidade de produção de lipases ligadas ao micélio de ambos os microrganismos referidos anteriormente.

Uma atividade intracelular semelhante a atividade intracelular do *T. koningii* em 96 h foi encontrada neste trabalho foi relatada por Marotti et al. (2017), que obtiveram 81,6 U/g de células secas, empregando o microrganismo *Penicillium citrinum* em condições de cultivo bastante semelhantes àquelas empregadas neste trabalho (FS, 30°C, 30 g/l de azeite de oliva e 72 h de incubação). Já o valor máximo de atividade intracelular encontrado por Castro et al. (2017) para o fungo filamentoso *Aspergillus westerdijkiae* foi igual a 52 U/g de micélio seco (FS, 25°C, 100 rpm, 72 h, 1% de azeite de oliva como fonte de carbono). Andrade et al. (2014) empregando o microrganismo *Mucor circinelloides* (FS, 72 h, 170 rpm, 30 °C, 10<sup>6</sup> esporos/ml) e azeite de oliva (30 g/l) como fonte de carbono obtiveram 66,8 U/g de células inteiras como atividade intracelular máxima.

Em relação ao perfil de produção, observado na Tabela 6, nota-se que o *T. koningii* apresentou em 24 horas de fermentação uma atividade lipásica que corresponde a aproximadamente 52% da atividade máxima alcançada no tempo de 96 h. O comportamento descrito não foi verificado para os demais microrganismos que apresentaram uma taxa de aumento da atividade lipásica mais lenta. Além disso, a maior produção de lipases intracelulares (42,9 UI/g) dentre todos os microrganismos estudados e um aumento expressivo frente aos demais fungos na concentração de biomassa seca nas primeiras 24 h de fermentação (0,11 a 7,1 g/l), podem ser evidências de que o *T. koningii* pode ser um bom produtor de lipases ligadas ao micélio.

Na Tabela 7 são observadas as atividades extracelulares para os fungos filamentosos estudados nas referidas condições de cultivo submerso (28 °C, 200 rpm e 96 h de incubação).

Tabela 7 – Atividade lipásica extracelular determinada para os microrganismos estudados sob cultivo submerso

| Tempo de fermentação (h) | Atividade Extracelular (UI/ml de caldo fermentado) |                             |                        |
|--------------------------|--|-----------------------------|------------------------|
|                          | <i>Aspergillus niger</i>                           | <i>Trichoderma koningii</i> | <i>Penicillium sp.</i> |
| 0                        | ND*  | ND*                         | ND*                    |
| 24                       | 3,8  | 1,1                         | 5,6                    |
| 48                       | 4,4  | 4,3                         | 6,4                    |
| 72                       | 5,1  | 8,1                         | 7,6                    |
| 96                       | 10,6   | 9,1                         | 6,7                    |

\*ND = Não determinado

É possível observar na Tabela 7 a atividade das lipases extracelulares em função da progressão do tempo de fermentação. Nota-se que dentre todos os microrganismos avaliados a atividade extracelular máxima observada foi igual a 10,6 UI/ml para o *A. niger*, em 96 horas de fermentação. No mesmo período de incubação o *T. koningii* apresentou uma produção enzimática semelhante ao *A. niger*, sendo ligeiramente menor (9,1 UI/ml).

O perfil de atividade lipásica extracelular (Tabela 7) indica que não houve uma progressão satisfatória da produção de lipases extracelulares para o *Penicillium sp.*, embora este último tenha apresentado valores de atividades enzimáticas superiores quando comparado aos demais microrganismos. A redução de 12% na atividade extracelular do *Penicillium sp.* no tempo de 72 h para 96 h (7,6 para



6,7 UI/ml) pode ser explicada considerando que após a exaustão dos nutrientes pode ter ocorrido a produção de proteases que podem ter hidrolisado as lipases produzidas e ocasionado a diminuição da atividade lipásica observada.

Um estudo conduzido por Lima et al. (2019b) empregou o fungo *Penicillium citrinum*, com azeite de oliva como única fonte de carbono e no tempo de 96 horas encontrou uma atividade extracelular no caldo fermentado igual a 11,0 U/mL. Marotti et al. (2017) encontraram 27,1 U/g como atividade extracelular máxima com o fungo *Penicillium camemberti*, em 72 h de fermentação. Dentre sete cepas fúngicas avaliadas por Andrade et al. (2012) 4,34 U/g foi a atividade extracelular máxima obtida pela cepa *Rhizomucor oryzae* 3231.

## 5.2 CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA SECA

Na Tabela 8 pode ser notado o perfil de concentração de biomassa seca para os fungos filamentosos estudados.

Tabela 8 – Concentração de biomassa seca determinada para os microrganismos estudados sob cultivo submerso

| Tempo de fermentação (h) | Biomassa seca (g/l)      |                             |                        |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------|
|                          | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Trichoderma koningii</i> | <i>Penicillium sp.</i> |
| 0                        | 0,05                     | 0,11                        | 0,04                   |
| 24                       | 2,1                      | 7,1                         | 2,3                    |
| 48                       | 6,9                      | 12,1                        | 10,6                   |
| 72                       | 7,7                      | 13,5                        | 13,7                   |
| 96                       | 8,6                      | 19,3                        | 15,9                   |

Em relação ao perfil de concentração de biomassa seca nota-se na Tabela 8 que houve um aumento progressivo da concentração de biomassa em função do tempo de fermentação para todos os microrganismos estudados. Em 24 horas para o *T. koningii* houve um aumento de aproximadamente 64 vezes em relação ao valor de concentração de biomassa inicial, enquanto para o *Aspergillus niger* este aumento foi igual a 42 vezes e de aproximadamente 57,5 vezes para o *Penicillium sp.* O maior valor de biomassa (19,3 g/l) foi observado em 96 h para o *T. koningii*, ressaltando que o *Penicillium sp.* apresentou um valor levemente inferior (15,9 g/l) no mesmo tempo de incubação. Nota-se ainda que, em comparação a todos os demais microrganismos estudados, o *A. niger*

apresentou a menor concentração de biomassa seca (8,6 g/l) em 96 h, visto que a partir de 48 h este microrganismo apresentou um crescimento pouco expressivo.

Um estudo de Lima et al. (2017) com *Penicillium citrinum* obteve uma concentração de biomassa seca igual a 49,3 g/l, que é expressivamente maior do que a concentração de biomassa máxima encontrada neste trabalho, visto que foram empregadas condições de cultivo semelhantes (azeite de oliva como única fonte de carbono/indutor e FS). Em um estudo realizado por Andrade et al. (2014) *Mucor circinelloides* URM 4182 foi empregado em condições semelhantes e encontrou 30,5 g/l de concentração de biomassa, em 72 horas de incubação. Uma concentração de biomassa para *Mucor piriformis* igual a 12,6 g/l foi encontrado por Andrade et al. (2012). A biomassa máxima para *Aspergillus niger* encontrada por Almyasheva et al. (2017) foi de 11,8 g/l em 60 h de fermentação, em condições de cultivo submerso (220 rpm, 30°C, 10,0 g/l de peptona, 15,0 g/l de óleo de soja e 5,0 g/l de extrato de levedura).

Nas Tabelas 9 e 10 são observadas as atividades lipásicas intracelular e extracelular específicas, respetivamente, determinadas em relação a concentração de biomassa seca para os microrganismos estudados.

As atividades enzimáticas específicas para as lipases intracelulares e extracelulares foram determinadas como a razão entre a atividade lipásica e a quantidade de microrganismo correspondente ao tempo de fermentação analisado. Logo, quão maior for a atividade lipásica e menor for a quantidade de microrganismo observada maior será a atividade lipásica específica calculada. Nesse contexto, a atividade extracelular específica máxima, calculada em relação aos dados mostrados na Tabela 10, foi obtida para o *Penicillium sp.* em 24 h (2434,8 UI/g de micélio seco) e nota-se que os valores de atividade específica para as lipases extracelulares são mais elevados em 24 h, com exceção do *T. koningii*.

A análise dos perfis de atividades específicas da Tabela 10 indica que o *T. koningii* apresenta um comportamento diferenciado em relação aos demais microrganismos estudados, uma vez que sua atividade específica extracelular aumentou de forma gradativa até 72 h, enquanto os demais microrganismos

apresentaram elevadas atividades extracelulares específicas nas primeiras 24 h de fermentação. Isso pode ser explicado considerando-se que as atividades lipásicas extracelulares (Tabela 7) do *A. niger* e *Penicillium sp.* foram significativamente maiores do que a atividade extracelular do *Trichoderma koningii* após 24 h de fermentação.

Tabela 9 – Atividade lipásica intracelular específica para os microrganismos estudados sob cultivo submerso

| Tempo de fermentação (h) | Atividade intracelular específica (UI/g de micélio seco) |                             |                        |
|--------------------------|--|-----------------------------|------------------------|
|                          | <i>Aspergillus niger</i>                                 | <i>Trichoderma koningii</i> | <i>Penicillium sp.</i> |
| 0                        | -  | -                           | -                      |
| 24                       | 9,4  | 42,9                        | 7,8                    |
| 48                       | 23,7   | 44,8                        | 19,3                   |
| 72                       | 31,4   | 69,8                        | 26,2                   |
| 96                       | 71,6   | 81,5                        | 40,9                   |

Tabela 10 – Atividade lipásica extracelular específica para os microrganismos estudados sob cultivo submerso

| Tempo de fermentação (h) | Atividade extracelular específica (UI/g de micélio seco) |                             |                        |
|--------------------------|--|-----------------------------|------------------------|
|                          | <i>Aspergillus niger</i>                                 | <i>Trichoderma koningii</i> | <i>Penicillium sp.</i> |
| 0                        | -  | -                           | -                      |
| 24                       | 1809,5   | 154,9                       | 2434,8                 |
| 48                       | 637,7  | 355,4                       | 603,8                  |
| 72                       | 662,3  | 600,0                       | 554,7                  |
| 96                       | 1232,6   | 471,5                       | 421,4                  |

Em relação a atividade intracelular específica (Tabela 9) nota-se que a atividade máxima foi observada em 96 horas para o microrganismo *T. koningii*, sendo igual a 81,5 UI/g de biomassa seca. Em adição, é possível observar que em 24 h de fermentação o *Trichoderma* apresentou simultaneamente uma alta atividade intracelular específica e uma baixa atividade extracelular específica, em relação aos respectivos valores encontrados para o *A. niger* e *Penicillium sp.* Para estes houve um aumento menos pronunciado da concentração de biomassa celular associado com a excreção da lipase para o meio externo, enquanto o *T. koningii* apresentou um aumento expressivo de concentração de biomassa seca em 24 h (quando comparado com a biomassa inicial) e não secretou lipases para o meio externo de forma acentuada. Isso pode indicar que há uma forte retenção

de lipases no micélio para o microrganismo citado, o que o torna uma opção interessante para biocatálise baseada no uso direto de biomassa fúngica com atividade lipásica.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

#### 5.3.1. Efeito da concentração de substrato

Nas figuras 4 a 9 são observados os perfis de atividade lipásica (velocidade de reação) em função do aumento da concentração de substrato (emulsão de azeite de oliva comercial) para as lipases produzidas.

O ajuste linear (Figuras 4b a 9b) mostrou que os dados experimentais se ajustaram bem ao modelo de Michaelis-Menten. Pela análise dos perfis de atividade lipásica (Figuras 4a a 9a) a intensificação nas concentrações de ácidos graxos no substrato de 93 a 465mM resultou em aumento considerável nas taxas de reação (Figuras 4 a 9) e para concentrações de substrato superiores a 558mM nota-se, em geral, que um ocorreu um platô no perfil de atividade lipásica (taxa de reação), que pode indicar uma provável saturação da enzima por elevadas concentrações de emulsão de azeite.

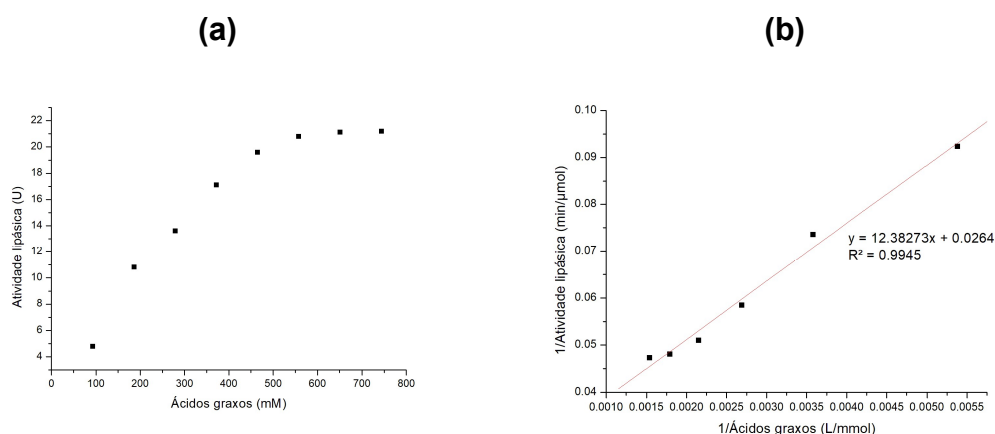


Figura 4 – a) Perfil de atividade lipásica para a lipase intracelular de *Aspergillus niger* b) Gráfico duplo-recíproco correspondente

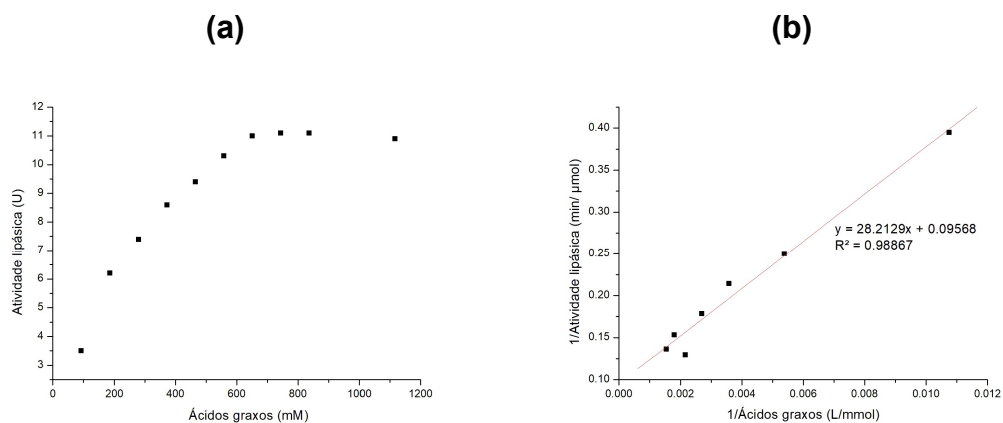


Figura 5 – a) Perfil de atividade lipásica para a lipase extracelular de *Aspergillus niger* e b) Gráfico duplo-recíproco correspondente

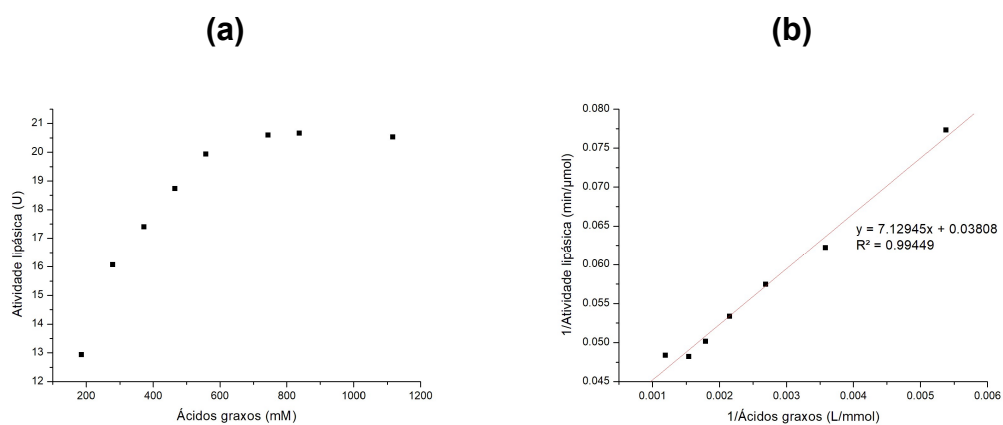


Figura 6 – a) Perfil de atividade lipásica para a lipase intracelular de *Trichoderma koningii* e b) Gráfico duplo-recíproco correspondente

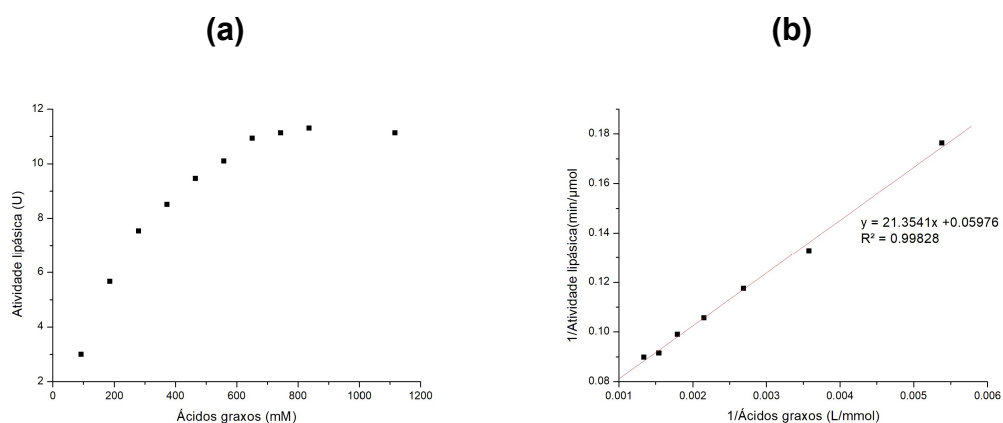


Figura 7 – a) Perfil de atividade lipásica para a lipase extracelular de *Trichoderma koningii* e b) Gráfico duplo-recíproco correspondente

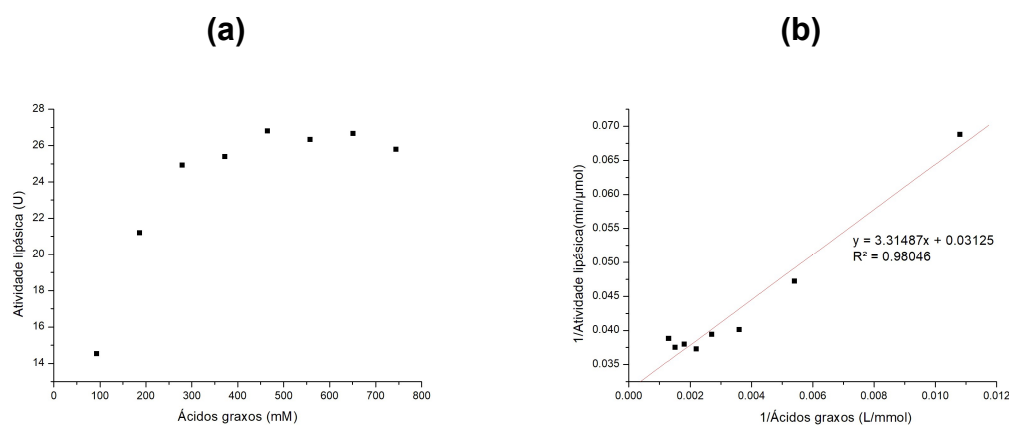


Figura 8 – a) Perfil de atividade lipásica para a lipase extracelular de *Penicillium sp.* e b) Gráfico duplo-recíproco correspondente

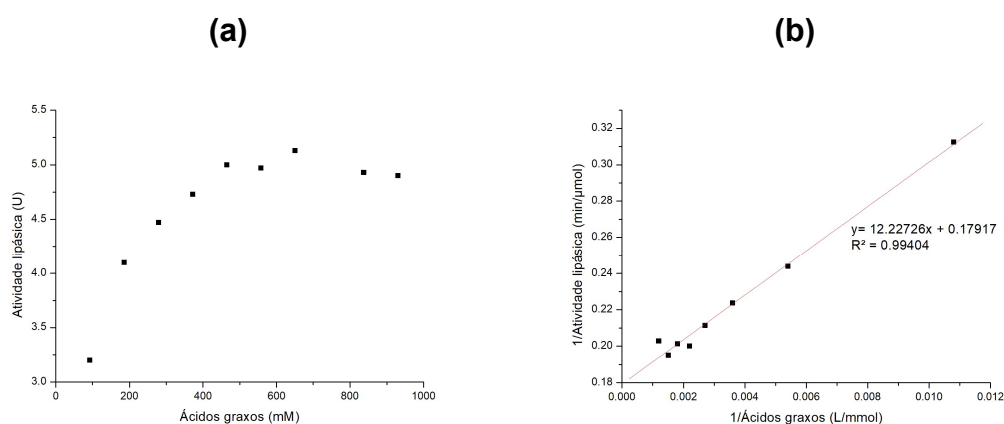


Figura 9 – a) Perfil de atividade lipásica para a lipase extracelular de *Penicillium sp.* e b) Gráfico duplo-recíproco correspondente

Os parâmetros cinéticos calculados para as lipases produzidas sob cultivo submerso são observados nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1 – Parâmetros determinados para as lipases extracelulares produzidas sob cultivo submerso

| Microrganismo               | $K_m$ Extracelular (mM) | $V_{máx.}$ Extracelular (UI) | Eficiência Catalítica $\times 10^{-2}$ (UI/mM) |
|-----------------------------|-------------------------|------------------------------|--|
| <i>Aspergillus niger</i>    | 294,87                  | 10,45                        | 3,5  |
| <i>Trichoderma koningii</i> | 357,33                  | 16,73                        | 4,7  |
| <i>Penicillium sp.</i>      | 68,24                   | 5,58                         | 8,2  |

Eficiência catalítica =  $V_{máx.} / K_m$

Quadro 2 – Parâmetros determinados para as lipases intracelulares produzidas sob cultivo submerso

| Microrganismo               | $K_m$ Intracelular (mM) | $V_{máx.}$ Intracelular (UI) | Eficiência Catalítica x $10^{-2}$ (UI/mM) |
|-----------------------------|-------------------------|------------------------------|---|
| <i>Aspergillus niger</i>    | 469,04                  | 37,88                        | 8,1                                       |
| <i>Trichoderma koningii</i> | 187,22                  | 26,26                        | 14,0                                      |
| <i>Penicillium sp.</i>      | 106,08                  | 32,0                         | 30,2                                      |

$$\text{Eficiência catalítica} = V_{máx.} / K_m$$

Os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{máx.}$  estão relacionados pelo fato de que o valor de  $K_m$  indica a concentração de substrato que permite a obtenção de uma velocidade de reação numericamente igual a metade de  $V_{máx.}$  (NELSON; COX, 2011). O parâmetro  $V_{máx.} / K_m$  indica o efeito cumulativo global de  $V_{máx.}$  e  $K_m$  na atividade da enzima (BADGUJAR; BHANAGE, 2016) e é um modelo útil para selecionar a enzima mais eficiente para um processo industrial usando uma concentração fixa de substrato inicial (FULLBROOK, 1996).

Para as lipases intracelulares os valores de  $K_m$  variaram de 106,08 a 469,04mM, enquanto para o  $V_{máx.}$  de 26,26 a 37,88 UI. As lipases extracelulares apresentaram para o  $K_m$  uma variação de 68,24 a 357,33mM, e o  $V_{máx.}$  foi 5,58 a 16,73 UI. As maiores eficiências catalíticas foram observadas para as lipases intracelulares e extracelulares do *Penicillium sp.*

O parâmetro  $K_m$  é independente da quantidade de enzima presente na reação. O menor  $K_m$  dentre todos os ensaios foi calculado para a lipase extracelular de *Penicillium sp.* (68,24mM). Um pequeno  $K_m$  indica que, para as mesmas concentrações de substrato, a enzima pode catalisar a transformação desse substrato a uma taxa maior do que quando o  $K_m$  é relativamente elevado (CARVALHO et al., 2010).

Um valor de  $V_{máx.}$  igual a 27,6  $\mu\text{mol}/\text{min}$  para a lipase produzida por *A. niger*, com azeite de oliva como substrato, foi encontrado por Santos et al. (2014). Valores de  $K_m$  iguais a 117mM e 77mM para as lipases produzidas por *A. niger*, com o azeite de oliva como substrato, foram relatados por Santos et al. (2014) e Santos et al. (2017), respectivamente. Em relação ao *T. koningii* não foram encontrados estudos na literatura sobre a determinação de parâmetros cinéticos.

### 5.3.2. Efeito dos parâmetros físico-químicos (Temperatura e pH)

Somente as lipases produzidas pelo fungo filamentoso *T. koningii* foram avaliadas quanto ao efeito da temperatura e do pH sobre a atividade lipásica. O *T. koningii* foi escolhido pela ausência completa de trabalhos publicados sobre a caracterização bioquímica das suas lipases, enquanto são numerosos os estudos acerca das lipases dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. As Atividades lipásicas (variável resposta) para as lipases intracelulares e extracelulares produzidas pelo *T. koningii* via FS, obtidas de acordo com as condições propostas no planejamento experimental fatorial completo 3<sup>2</sup>, podem ser notados na Tabela 11.

Tabela 11 – Atividades lipásicas intracelulares e extracelulares produzidas pelo *Trichoderma koningii* sob cultivo submerso nas diferentes condições de Temperatura e pH

| Ensaio n° | Temperatura (°C) | pH       | Atividade lipásica                  |  |
|-----------|------------------|----------|-------------------------------------|--|
|           |                  |          | Intracelular (UI/g de micélio seco) | Extracelular (UI/ml de caldo fermentado) |
| 1         | -1 (30)          | -1 (6,0) | 22,83                               | 2,27                                     |
| 2         | 0 (37)           | -1 (6,0) | 18,65                               | 8,00                                     |
| 3         | +1 (44)          | -1 (6,0) | 8,36                                | 3,47                                     |
| 4         | -1 (30)          | 0 (7,0)  | 68,81                               | 8,40                                     |
| 5         | 0 (37)           | 0 (7,0)  | 69,78                               | 8,40                                     |
| 6         | +1 (44)          | 0 (7,0)  | 62,06                               | 12,67*                                   |
| 7         | -1 (30)          | +1 (8,0) | 75,89                               | 12,80                                    |
| 8         | 0 (37)           | +1 (8,0) | 81,35                               | 13,20                                    |
| 9         | +1 (44)          | +1 (8,0) | 82,64                               | 10,53                                    |
| 10        | 0 (37)           | 0 (7,0)  | 71,39                               | 9,87                                     |
| 11        | 0 (37)           | 0 (7,0)  | 70,74                               | 9,20                                     |

\*Ensaio desconsiderado das análises estatísticas

O desvio-padrão da média do ponto central (estimativa do erro experimental) foi 0,81 UI/g para a atividade intracelular, e 0,73 UI/ml para a atividade extracelular. Os maiores valores de atividade lipásica intracelular foram observados no ensaio 9 (82,64 UI/g) e no ensaio 8 (81,35 UI/g). Para a atividade lipásica extracelular o



melhor resultado foi encontrado no ensaio 8 (13,20 UI/ml). Para as análises estatísticas da atividade lipásica extracelular o ensaio 6 foi desconsiderado.

Nas Tabela 12 e 13 são apresentados os efeitos estatisticamente significativos para as lipases produzidas pelo *T. koningii* via FS. Nota-se que para atividade intracelular todos os fatores (linear, quadrático e interação) foram considerados estatisticamente significativos, enquanto para a atividade extracelular somente os fatores temperatura quadrático e pH linear apresentaram p-valor inferior a 0,10. Tal diferença demonstra a particularidade de cada uma das formas de lipase estudadas.

Tabela 12 – Tabela dos efeitos estatisticamente significativos para a atividade lipásica do micélio de *Trichoderma koningii*

| Fatores                   | Efeito | Desvio Padrão | p-valor |
|---------------------------|--------|---------------|---------|
| Média                     | 54,704 | 0,255         | 0,000   |
| (1) Temperatura (°C) (L)* | -4,823 | 0,661         | 0,018   |
| Temperatura (°C) (Q)**    | 3,816  | 0,508         | 0,017   |
| (2) pH (L)                | 63,347 | 0,661         | 0,000   |
| pH (Q)                    | 19,251 | 0,508         | 0,001   |
| Interação 1L x 2L         | 10,611 | 0,809         | 0,006   |

\*(L) = fator linear; \*\*(Q) = fator quadrático, - = fatores não significativos estatisticamente ao modelo.

Tabela 13 – Tabela dos efeitos estatisticamente significativos para a atividade lipásica do caldo fermentado de *Trichoderma koningii*

| Fatores                   | Efeito | Desvio padrão | p-valor |
|---------------------------|--------|---------------|---------|
| Média                     | 8,171  | 0,249         | 0,001   |
| (1) Temperatura (°C) (L)* | -      | -             | 0,276   |
| Temperatura (°C) (Q)**    | 2,590  | 0,524         | 0,039   |
| (2) pH (L)                | 7,600  | 0,600         | 0,006   |
| pH (Q)                    | -      | -             | 0,369   |
| Interação 1L x 2L         | -      | -             | 0,142   |

\*(L) = fator linear; \*\*(Q) = fator quadrático, - = fatores não significativos estatisticamente ao modelo.

O efeito do fator pH linear na atividade intracelular é cerca de 13 vezes maior (em módulo) quando comparado ao efeito do fator temperatura linear e indica maior influência do fator pH sobre a atividade lipásica intracelular. Embora, os intervalos de condições operacionais aqui estudados não sejam capazes de avaliar a performance da enzima em condições extremas (pHs ácidos e

temperaturas superiores a 50°C) o presente estudo pode atuar como uma referência útil para trabalhos posteriores.

As Equações 3 e 4 consistem nos modelos de regressão obtidos ao avaliar os efeitos dos parâmetros físico-químicos estudados sobre a atividade de lipases intracelulares e extracelulares produzidas por *T. koningii* via FS. Somente os fatores estatisticamente significativos foram considerados nos modelos apresentados. É válido ressaltar que a validade dos modelos é restrita as condições do planejamento experimental ( $30 < T < 44^{\circ}\text{C}$  e  $6,0 < P < 8,0$ ) e o nível de significância utilizado foi 10%, p-valor menor que 0,10.

$$AI = -992,501 - 0,078T^2 + 273,144P - 19,251P^2 + 0,758TP \text{ (Eq. 3)}$$

$$R^2 = 0,99$$

$$AE = -88,504 + 4,705T - 0,053T^2 \text{ (Eq. 4)}$$

$$R^2 = 0,84$$

Em que:

AI = Atividade lipásica intracelular (UI/g) para o micélio de *T. koningii*; AE = Atividade lipásica extracelular (UI/ml) para o caldo fermentado de *T. koningii*; T = Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $30^{\circ}\text{C} < T < 44^{\circ}\text{C}$ ; P = pH  $6,0 < \text{pH} < 8,0$  e  $R^2$  = Coeficiente de correlação.

Na figura 10 são apresentadas as análises de resíduos dos modelos para atividade lipásicas intracelulares e extracelulares. Observa-se que os resíduos estão aleatoriamente e independentemente distribuídos, e seguem uma distribuição normal. Em adição, é possível afirmar que os valores dos coeficientes de determinação são satisfatórios ( $R^2$  mínimo = 0,84). Dessa forma, certifica-se que os modelos ajustados são adequados aos dados.

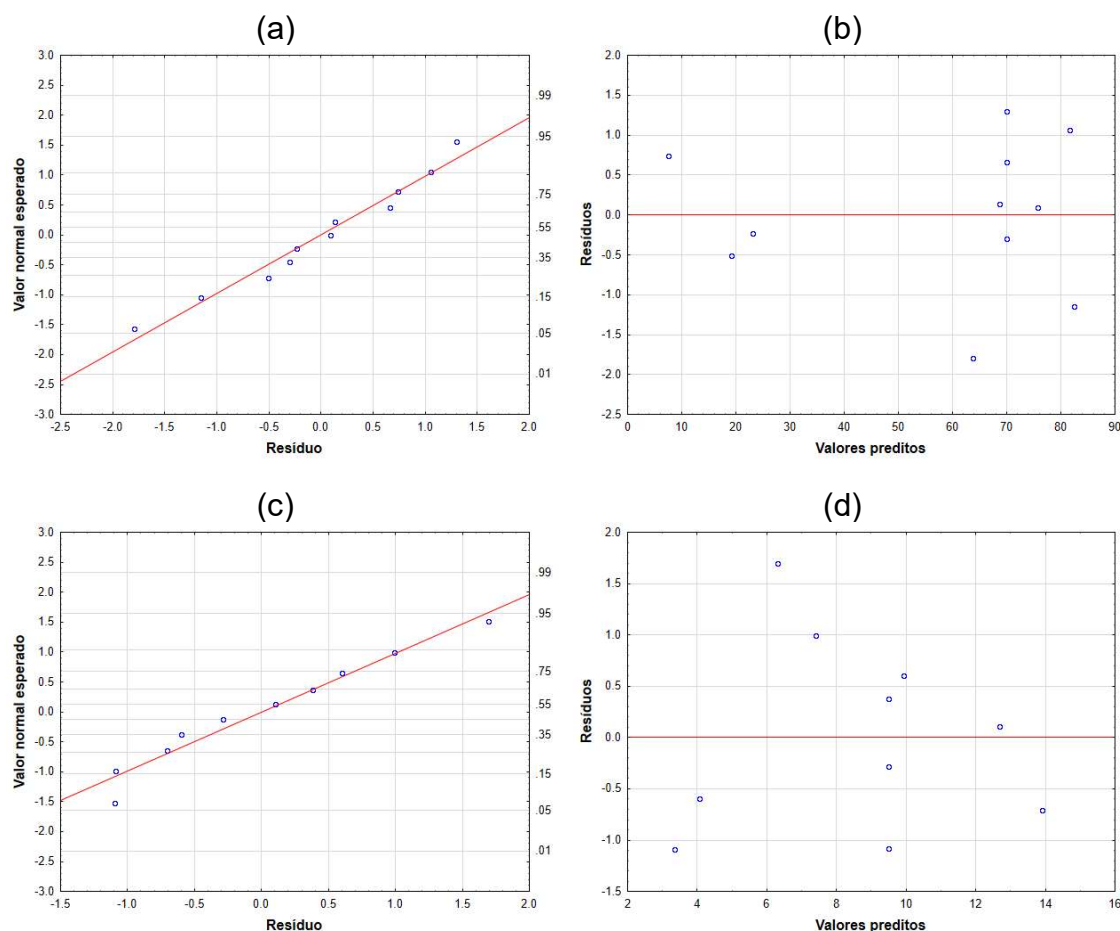


Figura 10 – Gráficos de probabilidade normal de resíduos e distribuição dos resíduos para lipases intracelulares (a e b, respectivamente) e lipases extracelulares (c e d, respectivamente)

As superfícies resposta são apresentadas na Figura 11 e apresentam um comportamento semelhante, quanto a localização das zonas de máxima atividade lipásica (cor vermelho intenso). Nota-se que para atividade intracelular (Fig. 11a), o aumento do pH e a manutenção das temperaturas reacionais em torno do ponto central levaram ao aumento da resposta, notado pela zona de coloração vermelho intenso no ponto mais elevado da superfície.

O conjunto de condições formado por temperaturas ligeiramente maiores que 37 °C (39 °C) e pelo pH levemente inferior a 8,0 (pH 7,86) maximizou a atividade lipásica intracelular (atividade máxima predita igual a 83,39 UI/g) e indicam que futuros estudos com o micélio de *T. koningii* podem ser desenvolvidos em tais condições reacionais. Já para as lipases extracelulares observou-se que a superfície resposta (Fig. 11b) apresentou um formato de sela, sendo assim

incapaz de determinar o ponto de máximo e suas coordenadas. No entanto, acredita-se que estas últimas estejam situadas em uma zona de temperatura de 37 a 44 °C e na faixa de pH de 7,8 a 8,0, assim como foi determinado para o micélio e no estudo de Marques (2013), o qual determinou que as condições ótimas de temperatura e pH para o extrato enzimático de *T. koningii* foram 37 °C e pH 8,0.

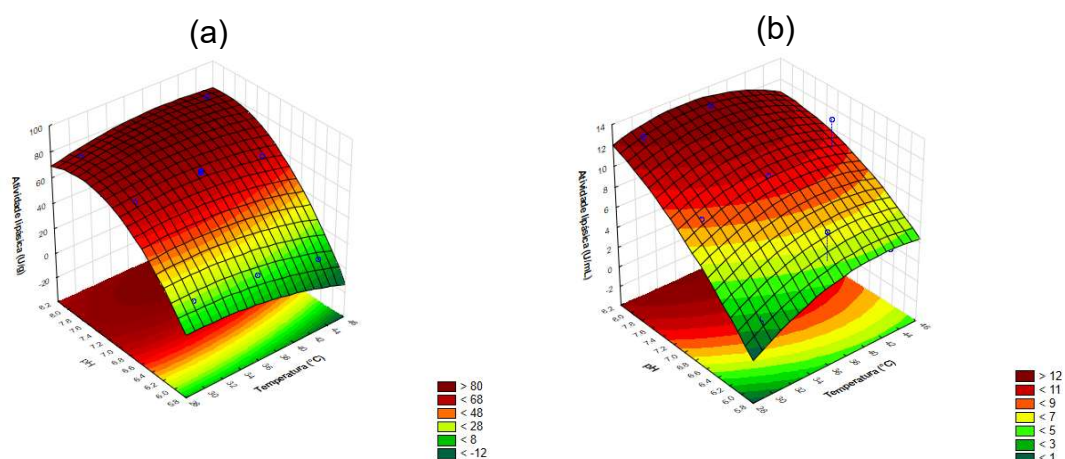


Figura 11 – Superfícies resposta obtidas a partir do planejamento experimental completo  $3^2$ . a) Superfície resposta para a atividade lipásica intracelular e b) Superfície resposta para a atividade lipásica extracelular

Sugere-se que em trabalhos futuros seja avaliada a estabilidade térmica e o efeito dos parâmetros físico-químicos (Temperatura e pH) sobre a atividade lipásica de todas as lipases intracelulares e extracelulares obtidas no presente trabalho. Com a determinação de parâmetros bioquímicos adicionais, como a  $K_d$  e o  $t_{1/2}$ , será possível avaliar melhor a empregabilidade de tais enzimas em indústrias com exigências específicas, como por exemplo a síntese enzimática do biodiesel. Ademais, para atestar a funcionalidade das lipases produzidas por cepas de fungos filamentosos pouco estudados ou isolados recentemente também é desejável investigar os inibidores e ativadores da atividade lipásica, a estabilidade em solventes orgânicos assim como a sua capacidade de esterificação/ transesterificação nesses meios, o que podem ser tópicos a serem explorados nestes estudos (CASTRO et al., 2017; ZANOTTO et al., 2009).

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que todos os microrganismos estudados sob condições de cultivo submerso (28 °C, 96 h e azeite de oliva como fonte de carbono) apresentam atividade lipásica no micélio e no caldo fermentado simultaneamente. O *T. koningii* apresentou a maior atividade lipásica intracelular (81,5 UI/g) após 96 horas de fermentação e em relação atividade lipásica extracelular as melhores atividades foram observadas para o *A. niger* (10,6 UI/ml) e para o *T. koningii* (9,1 UI/ml), nas condições de cultivo supracitadas. A inspeção das atividades específicas intracelulares e extracelulares indicou que o *T. koningii* apresentou um comportamento diferenciado, com indícios de que há uma forte retenção de lipases no micélio para esse fungo filamentoso. Os valores obtidos para o  $K_m$  variaram de 68,24 a 469,04mM e para o  $V_{m\acute{a}x}$  de 5,58 a 37,88 UI, com a emulsão de azeite de oliva comercial como substrato. A análise estatística demonstrou que o efeito do fator pH sobre a atividade lipásica intracelular do *T. koningii* é cerca de 13 vezes maior do que o efeito do fator temperatura. As temperaturas reacionais na faixa de 37 a 44 °C e o pH de 7,8 a 8,0 favoreceram a atividade enzimática das lipases produzidas pelo *T. koningii*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFARO-CHÁVEZ, A. L.; LIU, J. W.; PORTER, J. L.; GOLDMAN, A.; OLLIS, D. L. Improving on nature's shortcomings: evolving a lipase for increased lipolytic activity, expression and thermostability. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 32, n. 1, p. 13-24, 2019.
- ALMYASHEVA, N. R.; SHUKTUEVA, M. I.; PETROVA, D. A.; KOPITSYN, D. S.; KOTELEV, M. S.; VINOKUROV, V. A.; NOVIKOV, A. A. Biodiesel fuel production by *Aspergillus niger* whole-cell biocatalyst in optimized medium. **Mycoscience**, v. 59, n. 2, p. 147-152, 2018.
- ANDRADE, G. S. S.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Screening, immobilization, and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 183-188, 2012.
- ANDRADE, G. S.; CARVALHO, A. K.; ROMERO, C. M.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 12, p. 2539-2548, 2014.
- ANGKAWIDJAJA, C.; MATSUMURA, H.; KOGA, Y.; TAKANO, K.; KANAYA, S. X-ray crystallographic and MD simulation studies on the mechanism of interfacial activation of a family I. 3 lipase with two lids. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 1, p. 82-95, 2010.
- BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Lipase immobilization on hydroxypropyl methyl cellulose support and its applications for chemo-selective synthesis of  $\beta$ -amino ester compounds. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1420-1433, 2016.
- BCC RESEARCH. Global Lipase Market. Disponível em: <https://www.bccresearch.com/partners/verified-market-research/global-lipase-market.html>. Acesso em: 10 jan 2021.
- BENNETT, J. W. White paper: genomics for filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 21, n. 1, p. 3-7, 1997.
- BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 73-81, 2002.
- CARVALHO, A. K.; FARIA, E. L.; RIVALDI, J. D.; ANDRADE, G. S. S.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Performance of whole-cells lipase derived from *Mucor circinelloides* as a catalyst in the ethanolysis of non-edible vegetable oils under batch and continuous run conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 287-294, 2015.
- CARVALHO, N. M. F.; PIRES, B. M.; ANTUNES, O. A. C.; FARIA, R. B.; OSÓRIO, R. E. H. M. B.; PIOVEZAN, C.; NEVES, A. Uso de equações lineares na determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1607-1611, 2010.
- CASAS-GODOY, L., GASTEAZORO, F., DUQUESNE, S., BORDES, F., MARTY, A., & SANDOVAL, G. Lipases: an overview. In: **Lipases and Phospholipases**. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 3-38.
- CASTRO, F. F.; PINHEIRO, A. B. P.; NASSUR, C. B.; BARBOSA-TESSMANN, I. P. Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus westerdijkiae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 321-328, 2017.
- CHENG, C.; JIANG, T.; WU, Y.; CUI, L.; QIN, S.; HE, B. Elucidation of lid open and orientation of lipase activated in interfacial activation by amphiphilic

- environment. **International journal of biological macromolecules**, v. 119, p. 1211-1217, 2018.
- COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia da UFMG, 2006. 206p. Belo Horizonte, MG.
- COLLA, L. M., FICANHA, A. M., RIZZARDI, J., BERTOLIN, T. E., REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Production, and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; BENEDETTI, S.; LOSS, R. A.; LIMA, M. D.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 461-467, 2016.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Applications, and production of microbial lipases. **Revista CIATEC**, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.
- CORADI, G. V.; VISITAÇÃO, V. L.; LIMA, E. A.; SAITO, L. Y. T.; PALMIERI, D. A.; TAKITA, M. A.; NETO, P. O.; LIMA, V. M. G. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. **Annals of microbiology**, v. 63, n. 2, p. 533-540, 2013.
- 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, 2017.
- DEMAIN, A. L.; SÁNCHEZ, S. Enzymes of industrial interest. **Mexican journal of Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 74-97, 2017.
- DHEEMAN, D. S.; ANTONY-BABU, S.; FRÍAS, J. M.; HENEHAN, G. T. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium sp. DS-39* (DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 256-262, 2011.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3-4, p. 197-212, 2010.
- FERREIRA-LEITÃO, V.; CAMMAROTA, M.; GONÇALVES AGUIEIRAS, E., VASCONCELOS DE SÁ, L.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D. The protagonism of biocatalysis in green chemistry and its environmental benefits. **Catalysts**, v. 7, n. 1, p. 9, 2017.
- FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization, and biotechnological applications. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 632-644, 2011.
- FRISVAD, J. C. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 773, 2015.
- FULLBROOK, P. D. Practical applied kinetics. **Industrial Enzymology**, v. 2, p. 483-540, 1996.
- GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 241-253, 2018.
- GONÇALVES FILHO, D.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7399-7423, 2019.

- GUERRAND, D. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. *Oilseeds and fats crops and lipids*, v. 24, n. 4, p. D403, 2017.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. Trichoderma species—opportunistic, a virulent plant symbiont. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.
- HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.
- IUBMB. EC 3. Hydrolases. Introduction. Disponível em: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/intro.html>. Acesso em: 10 ago 2021a.
- IUBMB. Enzyme Nomenclature. EC 3.1.1.3 Disponível em: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/1/1/3.html>. Acesso em: 10 ago 2021b.
- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 315-351, 1999.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.
- JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS microbiology reviews**, v. 15, n. 1, p. 29-63, 1994.
- JAVEDA, S.; AZEEMA, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23-34, 2018.
- LI, N.; ZONG, M. 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, L. G. R.; GONÇALVES, M. M. M.; COURI, S.; MELO, V. F.; SANT'ANA, G. C. F.; COSTA, A. C. A. D. Lipase Production by *Aspergillus niger* C by Submerged Fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019a.
- LIMA, R. C.; SILVA, H. N. L.; PINOTTI, L. M. **Produção de lipases por *Penicillium sp.*** p. 679-682. In: São Paulo: Blucher, 2014. ISSN 2359-1757, doi:10.5151/chemeng-cobec-ic-07-eb-138. Acesso em: 05 out. 2021.
- LIMA, R. T.; ALVES, A. M.; DE PAULA, A. V.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S.S. Mycelium-bound lipase from *Penicillium citrinum* as biocatalyst for the hydrolysis of vegetable oils. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101410, 2019b.
- LIMA, R. T.; SATO, P. M.; PEREIRA, R. M.; ANDRADE, G. S. S. Mycelium-bound lipase production of immobilized whole cell from a wild-type *Penicillium citrinum* strain. **Intern. J. Eng. Res. Sci.**, v. 2, p. 1-10, 2017.
- LIU, G.; HU, S.; LI, L.; HOU, Y. Purification and characterization of a lipase with high thermostability and polar organic solvent-tolerance from *Aspergillus niger* AN0512. **Lipids**, v. 50, n. 11, p. 1155-1163, 2015.
- LIU, W., JIA, B.; ZHAO, H., XU, L.; YAN, Y. Preparation of a whole-cell biocatalyst of *Aspergillus niger* lipase and its practical properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10426-10430, 2010.
- LIU, X.; KOKARE, C. Microbial enzymes of use in industry. In: **Biotechnology of microbial enzymes**. Academic Press, 2017. p. 267-298.



- MALA, J. G. S.; TAKEUCHI, S. Understanding Structural Features of Microbial Lipases—An Overview. **Analytical chemistry insights**, v. 3, p. ACI. S551, 2008.
- MAROTTI, B. S., CORTEZ, D. V., GONÇALVES, D. B., & CASTRO, H. F. D. Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. **Química Nova**, v. 40, n. 4, p. 427-435, 2017.
- MARQUES, T. A. Produção de lipase por um novo isolado de *Trichoderma koningii* e emprego do efluente de laticínio como meio de fermentação. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. 2013.112p. Londrina, PR.
- MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: a review. **Journal of Biotech Research**, v. 8, 2017.
- MELANI, N. B.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E. Lipases: From Production to Applications. **Separation & Purification Reviews**, p. 1-16, 2019.
- MENONCIN, S., DOMINGUES, N.M., FREIRE, D.M.G., TONIAZZO, G., CANSIAN, R.L., OLIVEIRA, J.V., DI LUCCIO, M., DE OLIVEIRA, D. ; TREICHEL, H. Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 4, p. 537-544, 2010.
- NAESSENS, M.; VANDAMME, E.J. Multiple forms of microbial enzymes. *Biotechnol. Lett.*, v. 25, p. 715-721, 2002.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011, 1274p.
- OSHO, M. B.; AKPAN, I.; ADIO, O. Q. Screening, optimization and characterization of extracellular lipase of *Aspergillus niger* ATCC 1015. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 5, n. 2, p. 172, 2015.
- PANDEY, A., NIGAM, P., SOCCOL, C. R., SOCCOL, V. T., SINGH, D., & MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 31, p. 135-152, 2000.
- PRIJI, P.; SAJITH, S.; FAISAL, P. A.; BENJAMIN, S. MICROBIAL LIPASES—PROPERTIES AND APPLICATIONS. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 6, n. 2, p. 799, 2016.
- RAJESH, E. M.; ARTHE, R.; RAJENDRAN, R.; BALAKUMAR, C.; PRADEEPA, N.; ANITHA, S. Investigation of lipase production by *Trichoderma reesei* and optimization of production parameters. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry**, v. 9, n. 7, 2010.
- RAMOS-SÁNCHEZ, L. B.; CUJILEMA-QUITIO, M. C.; JULIAN-RICARDO, M. C.; CORDOVA, J.; FICKERS, P. Fungal lipase production by solid-state fermentation. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 5, n. 2, p. 1, 2015.
- RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; BEEVI UMMALYMA, S.; ABRAHAM, A.; KURUVILLA MATHEW, A.; MADHAVAN, A.; PANDEY, A. Applications of microbial enzymes in food industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 16-30, 2018.
- RIEGLER-BERKET, L., LEITMEIER, A., ASCHAUER, P., DREVENY, I., & OBERER, M. Identification of lipases with activity towards monoacylglycerol by criterion of conserved cap architectures. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1863, n. 7, p. 679-687, 2018.
- RODRIGUES, C., CASSINI, S. T., ANTUNES, P. W., KELLER, R. P., & GONÇALVES, R. F. Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases com base na atividade

lipásica e no potencial hidrolítica sobre óleo comestível de soja e espuma de caixa de gordura. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 507-518, 2016.

ROMERO, C. M., PERA, L. M., LOTO, F., VALLEJOS, C., CASTRO, G., & BAIGORI, M. D. Purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Aspergillus niger* MYA 135 and its application in ester synthesis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, ed. 1, p. 25-31, 2012.

ROMERO, C. M.; BAIGORI, M. D.; PERA, L. M. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 4, p. 861-866, 2007.

SANTOS, E. A. L., LIMA, A. S., SOARES, C. M. F., & DE AQUINO SANTANA, L. C. L. Lipase from *Aspergillus niger* obtained from mangaba residue fermentation: biochemical characterization of free and immobilized enzymes on a sol-gel matrix. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, n. 1, p. 1-8, 2017.

SANTOS, R. C. A., DE ARAÚJO, K. B., ZUBIOLO, C., SOARES, C. M. F., LIMA, A. S., & DE AQUINO SANTANA, L. C. L. Microbial lipase obtained from the fermentation of pumpkin seeds: immobilization potential of hydrophobic matrices. **Acta Scientiarum Technology**, v. 36, n. 2, p. 193-201, 2014.

SARMAH, N.; REVATHI, D.; SHEELU, G.; YAMUNA RANI, K.; SRIDHAR, S.; MEHTAB, V.; SUMANA, C. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. **Biotechnology progress**, v. 34, n. 1, p. 5-28, 2018.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.

SECUNDO, F., CARREA, G., TARABIONO, C., GATTI-LAFRANCONI, P., BROCCA, S., LOTTI, M., & EGGERT, T. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n. 1-4, p. 166-170, 2006.

SHABBIR, A.; MUKHTAR, H. Optimization process for enhanced extracellular lipases production from a new isolate of *Aspergillus terreus* ah-F2. **Pakistan Journal of Botany**, v. 50, n. 4, p. 1571-1578, 2018.

SHARMA, A. K.; SHARMA, V.; SAXENA, J. A review on applications of microbial lipases. **International Journal of Biotech Trends and Technology**, v. 19, n. 1, p. 1-5, 2016.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in organic solvent medium: Optimization using response surface methodology. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 4, p. 1247-1254, 2016.

SNELLMAN, E. A.; SULLIVAN, E. R.; COLWELL, R. R. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 23, p. 5771-5779, 2002.

STEINBERG, G., PEÑALVA, M. A., RIQUELME, M., WOSTEN, H., & HARRIS, S. D. Cell biology of hyphal growth. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 2, p. 1-34, 2017.

STÜBIGER, G., WUCZKOWSKI, M., MANCERA, L., LOPANDIC, K., STERFLINGER, K., & BELGACEM, O. Characterization of yeasts and filamentous fungi using MALDI lipid phenotyping. **Journal of Microbiological Methods**, v. 130, p. 27-37, 2016.

TACIN, M. V., MASSI, F. P., FUNGARO, M. H. P., TEIXEIRA, M. F. S., DE PAULA, A. V., & DE CARVALHO SANTOS-EBINUMA, V. Biotechnological valorization of oils from agro-industrial wastes to produce lipase using *Aspergillus* sp. from Amazon. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 17, p.369-378, 2019.

- TANG, L., SU, M., YAN, J., XIE, S., & ZHANG, W. Lid hinge region of *Penicillium expansum* lipase affects enzyme activity and interfacial activation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1218-1223, 2015.
- TREICHEL, H., DE OLIVEIRA, D., MAZUTTI, M. A., DI LUCCIO, M., & OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.
- TROIANO, D.; ORSAT, V.; DUMONT, M. J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, p. 109472, 2020.
- ÜLKER, S.; ÖZEL, A.; ÇOLAK, A.; KARAOĞLU, Ş. A. Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, n. 5, p. 543-550, 2011.
- VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J. M., GRAILLE, J., & HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.
- VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S. B.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014.
- WANG, Y., MA, R., LI, S., GONG, M., YAO, B., BAI, Y., & GU, J. An alkaline and surfactant-tolerant lipase from *Trichoderma lentiforme* ACCC30425 with high application potential in the detergent industry. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 95, 2018.
- WILLEMS, N., LELIMOUSIN, M., KOLDSØ, H., & SANSOM, M. S. Interfacial activation of M37 lipase: A multi-scale simulation study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1859, n. 3, p. 340-349, 2017.
- WÖSTEN, H. A. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 59, p. 65-70, 2019.
- YAACOB, N., KAMARUDIN, N. H. A., LEOW, A. T. C., SALLEH, A. B., RAHMAN, R. N. Z. R. A., & ALI, M. S. M. Effects of Lid 1 Mutagenesis on Lid Displacement, Catalytic Performances and Thermostability of Cold-active *Pseudomonas* AMS8 Lipase in Toluene. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 17, p. 215-228, 2019.
- ZANOTTO, S. P.; ROMANO, I. P.; LISBOA, L. U.; DUVOISIN JR, S.; MARTINS, M. K.; LIMA, F. A.; SILVA, S. F.; ALBUQUERQUE, P. M. Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from Amazonian fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1046-1059, 2009.
- ZHANG; X. F.; AI; Y. H., XU; Y.; YU, X. W. High-level expression of *Aspergillus niger* lipase in *Pichia pastoris*: Characterization and gastric digestion in vitro. **Food Chemistry**, v. 274, p. 305-313, 2019.