

Atividade específica lipolítica em fungos coletados do bagaço de cana-de-açúcar

Specific lipolytic activity in fungus collected from sugarcane bagasse

Dâmaris Hadassa Rangel Fonseca Bessa¹, Carlos Frederico de Souza Castro², Amanda Oliveira Souza³, Antonio Carlos Pereira de Menezes Filho⁴, Mariana Costa Mello Gonçalves⁵

RESUMO: Lipases são enzimas que são capazes de catalisar reações químicas e, em específico, catalisam ligações lipídicas. Essas enzimas podem ser obtidas a partir de fungos lipolíticos que por meio de uma fonte de carbono conseguem produzir altos níveis de lipases. Fungos que foram previamente selecionados do bagaço de cana-de-açúcar foram colocados para realizar fermentação submersa utilizando como única fonte de carbono o azeite de oliva extra-virgem. O caldo produzido desses fungos foi analisado por meio de espectrofotometria utilizando como substrato o *p*-NPB, os resultados obtidos foram analisados por meio de estatística com 5% de significância. Com a presente pesquisa foi possível identificar fungos capazes de crescerem em meio mineral com uma única fonte lipídica de carbono e quantificar atividades específicas de lipases utilizando o substrato *p*-NPB, foi possível então obter valores promissores de atividade específica lipolítica de três fungos 8,004 U mg⁻¹, 5,897 U mg⁻¹, 5,077 U mg⁻¹, para os fungos *Paecilomyces formosus* (primeiro isolado), *Paecilomyces formosus* (segundo isolado) e *Aspergillus tubingensis*, que são valores citados pela primeira vez para esses três fungos e se comparados a outros microrganismos da literatura são mais altos e ativos para serem utilizados em processos industriais.

Palavras-chave: *Aspergillus tubingensis*. Lipases. Microbiologia. *Paecilomyces formosus*.

ABSTRACT: Lipases are enzymes which catalyze chemical reactions, especially lipidic bonds. Enzymes may be retrieved from lipolytic fungi which produce high rates of lipases from a carbon source. Fungus previously selected from sugarcane bagasse underwent submersed fermentation with extra-virgin olive oil as the carbon source. Broth produced by the fungus was analyzed by spectrophotometry with substrate *p*-NPB and results were analyzed at 5% level. Current assay identified fungus which was capable of growth in a mineral medium with sole lipid carbon source and quantifies specific activities of lipases by substrate *p*-NPB. Best rates of specific lipid activities of the three fungi were 8.004 U mg⁻¹, 5.897 U mg⁻¹, 5.077 U mg⁻¹, for fungus *Paecilomyces formosus* (first isolate), *Paecilomyces formosus* (second isolate) and *Aspergillus tubingensis*, which are rates cited for the first time for the three fungi. When compared to other microorganisms in the literature, they are higher and more active to be used in industrial processes.

Keywords: *Aspergillus tubingensis*. Lipases. Microbiology. *Paecilomyces formosus*.

Autor correspondente:

Dâmaris Hadassa Rangel Fonseca Bessa: damarishadassa@hotmail.com

Recebido em: 02/01/2020

Aceito em: 16/06/2020

INTRODUÇÃO

Em tempos de industrialização e avanços tecnológicos, novas pesquisas em vários ramos da sustentabilidade foram desenvolvidas, como a busca de enzimas de baixo custo para o processamento de alimentos. A busca pela química verde faz regulamentações para o uso de materiais renováveis, incentivando a aplicação de catalisadores biológicos, com isso ocorre a redução da poluição ambiental trazendo melhores condições para a saúde humana (ATALAH *et al.*, 2019).

¹ Mestre em Agroquímica pelo Programa de Pós-graduação em Agroquímica (PPGAq) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IFG), Rio Verde (GO), Brasil.

² Docente Permanente do Programa de Pós-graduação em Agroquímica (PPGAq) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IFG), Rio Verde (GO), Brasil.

³ Docente temporária no Colégio Estadual Alfredo Nasser, Novo Brasil (GO), Brasil.

⁴ Doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias (PPGCA) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IFG), Rio Verde (GO), Brasil.

⁵ Gerente de pesquisa e docente permanente de Ensino Básico, Técnico e Tecnológico, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IFG), Rio Verde (GO), Brasil, Doutora em Microbiologia Agropecuária - Unesp - Jaboticabal (SP), Brasil.

Esses biocatalisadores são diversos, podendo destacar as lipases, que possuem suma importância industrial e que estão sendo buscadas para atender demandas em indústrias farmacêuticas e alimentícias, onde prevalecem as reações de transesterificação e esterificação (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019). A necessidade de catalisadores mais acessíveis pode alterar o uso de catalisadores químicos para enzimáticos, facilitando seu uso em reações de transesterificação. Os catalisadores biológicos mostram alta eficiência catalítica, sendo muitas vezes superiores aos catalisadores sintéticos e inorgânicos (NELSON; COX; LEHNINGER, 2013) in edition after bestselling edition, Principles of Biochemistry has put those defining principles into practice, guiding students through a coherent introduction to the essentials of biochemistry without overwhelming them. The new edition brings this remarkable text into a new era. Like its predecessors, Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition strikes a careful balance of current science and enduring concepts, incorporating a tremendous amount of new findings, but only those that help illustrate biochemistry's foundational principles. With this edition, students will encounter new information emerging from high throughput DNA sequencing, x-ray crystallography, and the manipulation of genes and gene expression, and other techniques. In addition, students will see how contemporary biochemistry has shifted away from exploring metabolic pathways in isolation to focusing on interactions among pathways. They will also get an updated understanding of the relevance of biochemistry to the study of human disease (especially diabetes. Estes apresentam vantagens sobre os catalisadores químicos, pois eles têm alta seletividade catalisando um único tipo de substrato, com características biodegradáveis, diminuindo os impactos ao meio ambiente.

Nesses catalisadores há enzimas capazes de acelerar as reações químicas, como a hidrólise, a esterificação, a transesterificação, a alcoolização, entre outras, possuem alta especificidade, baixo custo em condições de reação moderada, por exemplo as proteases, amilases, lipases e carboidrases (RIOS *et al.*, 2018). Diante dessas reações químicas descritas, o processo é considerado mais limpo se comparado aos catalisadores químicos, pois provém de material biológico, que é facilmente degradado, além de alguns produtos obtidos dessas reações, por exemplo, o biodiesel é favorecido pela sua baixa emissão de poluentes em comparação com os combustíveis fósseis, que seriam provenientes de reações químicas com catalisadores não degradáveis (AHMAD *et al.*, 2019).

Então um desses biocatalisadores são as lipases, que são enzimas que possuem a capacidade de catalisar compostos de característica lipídica, onde ao se romper estas moléculas por hidrólise, os lipídios podem ser encontrados de diferentes formas como triacilgliceróis, glicerofosfolipídios, esfingomiélna, esteróis, entre outros. As enzimas podem ser obtidas por diferentes tipos de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras, como a lipase por *Pseudomonas aeruginosa*, que foi fundida com sucesso na superfície de *Pichia pastoris* X33, mostrando eficiência de atividade lipásica em relação à massa seca do microrganismo (RAOUFI; GARGARI, 2018).

Um parâmetro que influencia a produção de enzimas além do tipo de microrganismos são as diferentes fontes de carbonos utilizadas para o crescimento do microbiano, pesquisadores demonstraram que *P. echinulatum* consegue produzir diferentes enzimas, sendo a quantidade influenciada pela fonte de carbono presente no meio. Esses pesquisadores utilizaram bagaço de cana-de-açúcar, celulose, glicose e glicerol, fizeram uma comparação e constataram que o meio de cultura com celulose apresentou maior atividade enzimática, seguido do glicerol (SCHNEIDER *et al.*, 2018). Outro estudo (TURATI *et al.*, 2019) obteve maior produção de lipases de *Penicillium* sp., utilizando como fonte de carbono o azeite de oliva, tendo sido observada atividade enzimática máxima com decanoato de *p*-nitrofenila como substrato. O uso de resíduos como o bagaço de cana-de-açúcar proporciona boa opção na produção de metabólitos secundários microbianos e geraram alto valor aos subprodutos agroindustriais.

Já para a identificação das atividades lipolíticas em fungos; existe um método de quantificação para lipases, onde se emprega o uso de etileno glicol como co-solvente do *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB), onde o substrato estava presente em meio tampão aquoso e a aferição da atividade de lipase se dá com a liberação do *p*-nitrofenol, é um método fácil, econômico e de rápido manuseio (FREITAS, 2017). Para esta produção de lipases os microrganismos podem catalisar diversas fontes de carbono como substrato, ocasionando diferentes propriedades como a fermentação sub-

mersa e a sólida, onde as lipases obtidas por fermentação submersa são mais estáveis (COLLA *et al.*, 2015).

As lipases possuem aplicações em diferentes produtos pela sua capacidade de degradação de óleos e gorduras, portanto são eficazes quando aplicadas em produtos de limpeza, como detergentes para desinfecção do instrumental cirúrgico (SAHAY; CHOUHAN, 2018), em medicamentos (DANINO *et al.*, 2016), para cosméticos (LORENZETTI, 2007) e transesterificação (CANET *et al.*, 2017).

Nas reações de transesterificação catalisadas por lipases ocorre a formação de subprodutos que influenciam a reação e a atividade lipídica, onde é preciso observar a especificidade da enzima e do substrato a ser catalisado, pois lipases seletivas de determinadas posições podem causar reações intermediárias de transesterificação de baixa significância, resultando uma percentagem menor de conversão (CANET *et al.*, 2017).

Com isso, as lipases são amplamente estudadas para aumentarem suas atividades em processos, como para transesterificação e estabilidade em solventes orgânicos (KAJIWARA *et al.*, 2017), para o aprimoramento da termoestabilidade através de lipases mutantes (MADAN; MISHRA, 2014), na imobilização do catalisador como estratégia para aumentar a eficiência de produtividade em bioprocessos (OLIVEIRA; BASTOS; DE LA TORRE, 2019).

O objetivo deste estudo foi realizar a prospecção de enzimas lipolíticas em fungos coletados a partir do bagaço de cana-de-açúcar por fermentação submersa e avaliar o potencial em comparação à literatura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CULTIVO E REPLICAÇÃO DOS FUNGOS

Foi preparado meio BDA (batata, dextrose, ágar) (SARDIN *et al.*, 2017) com adaptações, onde foi demonstrada a representabilidade do meio de cultura ser eficaz para a replicação de fungos; foi preparado o meio com 10% de ágar e 10% de dextrose, sob agitação e aquecimento suave sem ebulição. Em seguida, o meio nutritivo e as placas de Petri com 9 cm de diâmetro; foram autoclavadas. Em câmara de fluxo laminar, cerca de 17 linhagens fúngicas haviam sido selecionadas e identificadas a partir de amostras de solo do Cerrado. A replicação ocorreu em estufa bacteriológica a 28 °C durante 7 dias.

2.2 PRODUÇÃO DO CALDO ENZIMÁTICO

Após a cultura dos fungos, foi preparado meio mineral contendo 7 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 2,5 g L⁻¹ de Na₂HPO₄·7H₂O; 1,5 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O; 0,15 g L⁻¹ de CaCl₂·2H₂O; 0,02 g L⁻¹ de FeCl₃·6H₂O; 0,06 g L⁻¹ de ZnSO₄·7H₂O; 0,5 g L⁻¹ MnSO₄·H₂O; e Extrato de levedura com 0,5 g L⁻¹ (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2002). Esse procedimento relata os parâmetros ideais para o meio de cultura mineral. O experimento foi realizado em triplicata, onde, para cada fungo, um frasco *Erleynmeyer* contendo 50 mL de meio mineral e 1% de azeite de oliva foi adicionado, sendo esta a única fonte de carbono. Os *Erleynmeyers* foram esterilizados em autoclave. Em seguida, em uma câmara de fluxo laminar, os fungos foram inseridos no meio mineral, os frascos foram devidamente tampados, e levados para uma mesa agitadora com agitação a 85 rpm por 8 dias sob temperatura ambiente. Após este período, os caldos foram filtrados em papel de filtro qualitativo faixa azul, e, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm. O caldo enzimático foi então armazenado sob resfriamento a 4 °C até a quantificação das lipases.

2.3 QUANTIFICAÇÃO DE LIPASES

2.3.1 Quantificação do Teor de Proteínas

O procedimento foi realizado de acordo com o *Enzymatic of Lipoprotein Lipases* (BRAGA, 2009; FREITAS, 2017) com adaptações, onde o primeiro autor descreve parâmetros utilizando o substrato *p*-NPB e o segundo autor utiliza três substratos distintos, o substrato laurato de *p*-nitrofenil (*p*-NFL), o *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NFP) além do *p*-NPB. No espectrofotômetro UV-vis (Bel, UV-M51), o equipamento foi zerado utilizando uma cubeta de quartzo de campo único com 1000 μL de água destilada, posteriormente fez a leitura do teor de proteínas, foi acrescentado na cubeta de quartzo 100 μL do caldo enzimático bruto (amostra) e mais 900 μL de água destilada e fez a leitura em um comprimento de onda (λ) de 260 e 280 nanômetros (nm).

Foi adotado o cálculo do teor de proteínas em mg de proteína mL^{-1} de enzima, de acordo com a Fórmula (1):

$$\text{Teor de proteínas} = 1.55 * \text{Abs } 280 \text{ nm} - 0.76 * \text{Abs } 260 \text{ nm} \quad (1)$$

2.3.2 Quantificação da Atividade Lipolítica

As leituras foram realizadas conforme o procedimento anteriormente descrito, onde foi realizada a leitura em 400 nm nos intervalos de tempos entre 0, 5, 15 e 30 minutos. Em uma cubeta de vidro foi acrescentado 3000 μL de água destilada e posteriormente zerou-se o equipamento em 400 nm, após, em outra cubeta de vidro, acrescentou-se 900 μL de solução tampão de fosfato de sódio 100 mM, com cloreto de sódio 150 mM e 0,5% de triton, posteriormente adicionou-se 100 μL do caldo enzimático bruto, 10 μL de solução *p*-NPB 50 mM, e mais 2000 μL de solução tampão, imediatamente a cubeta foi transferida para o equipamento e realizou-se as leituras nos tempos determinados. Para o branco realizou-se o mesmo procedimento, porém o caldo enzimático foi levado para o micro-ondas a 900 watts de potência durante 5 minutos.

Para determinação da unidade de lipases por mL^{-1} (atividade volumétrica lipolítica), foi empregado o seguinte cálculo, conforme a Fórmula (2):

$$\text{Unidade } \text{mL}^{-1} \text{ de enzima} = \frac{(\Delta A_{400\text{nm}} \text{ min. Teste} - \Delta A_{400\text{nm}} \text{ min. Branco}) (1,01)(df)}{(0,0148)(0,1)} \quad (2)$$

Onde:

1,01 = Volume

df = é o Fator de diluição

0,0148 = Coeficiente de extinção Micromolar de *p*-nitrofenol com Absorbância (A) em 400 nm

0,1 = Volume em mililitros da enzima usada

Para determinação da atividade lipolítica específica em unidade por mg de proteína, é necessário realizar o cálculo conforme a Fórmula (3):

$$\text{Unidade } \text{mg} \text{ de proteína} = \frac{\text{Unidade } \text{mL} \text{ de enzima}}{\text{mg de proteína mL de enzima}} \quad (3)$$

A reação entre *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB), na presença de uma solução aquosa e a enzima lipolítica, forma o *p*-nitrofenol e o ácido butírico, conforme a Figura 1.

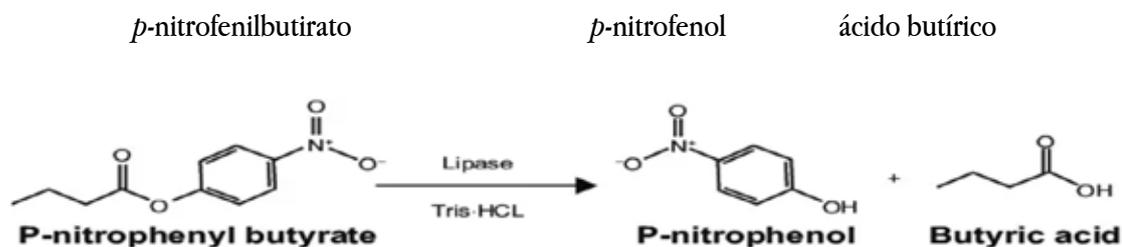


Figura 1. Representação da reação com p -NPB catalisada por lipase.

Fonte: Zaid *et al.* (2017).

Segundo Zaid *et al.* (2017) a presença do p -NPB na reação com a lipase; quebra a ligação formando p -nitrofenol, que desencadeia a formação de cor em tom amarelo na solução, sendo possível a quantificação pela Abs em ($\lambda = 400$ nm). Como resultado da reação das enzimas presentes no meio com p -NPB, o valor de absorção aumenta, podendo assim ser calculada junto ao teor de proteínas em Abs a 260 e 280 nm, onde o teor quantitativo de enzimas é determinado por mL e as unidades de lipases por mg durante um período de 30 minutos.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata, os dados estatísticos foram avaliados pela diferença estatística pelo teste de *Tukey* a ≤ 0.05 . Os dados foram avaliados através do *software Project for Statistical Comptuing* versão (3.5.0 de 2018).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 FERMENTAÇÃO LÍQUIDA

Os fungos foram capazes de se desenvolver com eficiência e produzir metabólitos, utilizando o azeite de oliva como fonte de carbono durante o período de estudo. Os fungos apresentaram metabolismo ativo e foram observados em crescimento no meio mineral; o desenvolvimento destes ocorreu nas gotas de azeite presentes no meio, como pode ser observado na Figura 2.



Figura 2. *Paecilomyces parvisporus* em desenvolvimento no meio mineral contendo o azeite de oliva como única fonte de carbono.

Fonte: Próprio autor.

3.2 QUANTIFICAÇÃO ESTATÍSTICA DE LIPASES

Na Tabela 1 estão apresentados os valores médios dos quantitativos proteicos totais em mg mL⁻¹.

Tabela 1. Valores médios para os teores de proteínas (mg mL⁻¹)

Grupos	Tratamentos	Médias
Teste de homogeneidade de variância		
valor-p: 0,0171833		
teste de Tukey		
A	<i>Fusarium fujikuroi</i>	2,353 ± 1,15
ab	<i>Aspergillus fumigates</i>	1,547 ± 0,60
ab	<i>Fusarium proliferatum</i>	1,415 ± 0,47
ab	<i>Aspergillus tubingensis</i>	1,345 ± 0,35
ab	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1,332 ± 0,23
ab	<i>Aspergillus fumigates</i>	1,296 ± 0,84
ab	<i>Aspergillus flavus</i>	1,111 ± 0,36
B	<i>Paecilomyces formosus</i>	0,911 ± 0,09
B	<i>Aspergillus Niger</i>	0,801 ± 0,15
B	<i>Trichoderma barzinaum</i>	0,789 ± 0,24
B	<i>Aspergillus novoparsiticus</i>	0,748 ± 0,65
B	<i>Paecilomyces parvisporus</i>	0,735 ± 0,25
B	<i>Mucor circinelloides</i>	0,620 ± 0,12
B	<i>Fusarium oxysporum</i>	0,501 ± 0,17
B	<i>Aspergillus fumigates</i>	0,448 ± 0,22
B	<i>Paecilomyces formosus</i>	0,370 ± 0,27
B	<i>Paecilomyces formosus</i>	0,215 ± 0,05

Teste de variância para valor-p, realizado através das médias em triplicata. Letras iguais não diferenciam pelo teste de Tukey a 5%.

Nessa tabela (1), a diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% aponta que os valores da concentração de proteínas são separados em dois grupos distintos, compostos pelo grupo **a** - *F. fujikuroi*, *A. fumigatus*, *F. proliferatum*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. fumigatus*, *A. flavus*; e pelo grupo **b** - composto por *A. fumigatus*, *F. proliferatum*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *P. formosus*, *A. niger*, *T. barzinaum*, *A. novoparsiticus*, *P. parvisporus*, *M. circinelloides*, *F. oxysporum*, *A. fumigatus*, *P. formosus* e *P. formosus*, sendo os fungos *Fusarium fujikuroi* e *Aspergillus fumigatus* com maior taxa de produção proteica.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores médios de atividade volumétrica lipolítica em U mL⁻¹.

Tabela 2. Valores médios para as atividades lipolíticas volumétricas (U mL⁻¹)

Grupos	Tratamentos	Médias
a	<i>A. tubingensis</i>	6,073 ± 2,01
b	<i>P. formosus</i>	3,116 ± 1,10
bc	<i>F. proliferatum</i>	2,070 ± 0,45
bc	<i>P. formosus</i>	1,911 ± 0,95
bc	<i>P. formosus</i>	1,910 ± 0,71
bc	<i>P. parvisporus</i>	1,683 ± 0,41
bc	<i>M. circinelloides</i>	1,342 ± 0,16
bc	<i>A. flavus</i>	1,182 ± 0,24
bc	<i>A. novoparsiticus</i>	1,069 ± 0,32
c	<i>A. niger</i>	0,933 ± 0,79
c	<i>A. brasiliensis</i>	0,796 ± 0,28
c	<i>A. fumigatus</i>	0,705 ± 0,17
c	<i>A. fumigatus</i>	0,682 ± 0,29
c	<i>A. fumigatus</i>	0,659 ± 0,22
c	<i>F. oxysporum</i>	0,637 ± 0,32
c	<i>F. fujikuroi</i>	0,455 ± 0,17
c	<i>T. barzianum</i>	0,273 ± 0,00

Teste de variância para valor-p, realizado através das médias em triplicata. Letras iguais não diferenciam pelo teste de Tukey a 5%.

Os resultados dessa tabela, são calculados conforme a Fórmula 2, onde observa-se a representatividade em volume da quantidade de lipases presentes em um determinado caldo enzimático. Em *A. tubingensis* pode ser observado o maior resultado da atividade volumétrica lipolítica média em U mL⁻¹. A Tabela 2 apresenta os resultados em relação aos valores médios de atividade lipolítica específica em U mg⁻¹, calculados conforme a Fórmula 3, onde é possível obter qual ou quais fungos produziram o maior quantitativo da atividade de lipase específica. O fungo *P. formosus* foi o indivíduo que apresentou maior valor de lipase produzida.

Na Tabela 2 observa-se que através do nível de significância a 5%, os valores médios de atividade volumétrica proteica apresentam três grupos distintos estatisticamente. O primeiro composto por **a** - *Aspergillus tubingensis*; o segundo por **b** - *P. formosus*, *F. proliferatum*, *P. formosus*, *P. formosus*, *P. parvisporus*, *M. circinelloides*, *A. flavus*, *A. novoparsiticus*; e para o terceiro grupo, **c** - formado por *F. proliferatum*, *P. formosus*, *P. formosus*, *P. parvisporus*, *M. circinelloides*, *A. flavus*, *A. novoparsiticus*, *A. niger*, *A. Brasiliensis*, *A. fumigatus*, *A. fumigatus*, *A. fumigatus*, *F. oxysporum*, *F. fujikuroi*, *T. barzianum*, sendo que os fungos *A. tubingensis* e *P. formosus* apresentaram os maiores volumes proteicos, além de; diferirem dos demais tratamentos neste estudo.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados médios para as atividades lipolíticas específicas expressas em U mg⁻¹.

Tabela 3. Valores médios para as atividades lipolíticas específicas (U mg⁻¹)

Grupos	Tratamentos	Médias
a	<i>P. formosus</i>	8,004 ± 1,35
ab	<i>P. formosus</i>	5,897 ± 1,78
abc	<i>A. tubingensis</i>	5,077 ± 3,28
bcd	<i>P. formosus</i>	3,402 ± 1,06
cd	<i>P. parvisporus</i>	2,406 ± 0,68
cd	<i>M. circinelloides</i>	2,191 ± 0,25
cd	<i>A. novoparsiticus</i>	1,903 ± 0,86
cd	<i>A. fumigatus</i>	1,723 ± 0,61
cd	<i>F. proliferatum</i>	1,626 ± 0,86
d	<i>F. oxysporum</i>	1,268 ± 0,60
d	<i>A. flavus</i>	1,171 ± 0,52
d	<i>A. niger</i>	1,092 ± 0,74
d	<i>A. brasiliensis</i>	0,624 ± 0,31
d	<i>A. fumigatus</i>	0,575 ± 0,15
d	<i>A. fumigatus</i>	0,505 ± 0,30
d	<i>T. barzianum</i>	0,369 ± 0,12
d	<i>F. fujikuroi</i>	0,212 ± 0,10

Teste de variância para valor-p, realizado através das medias em triplicata. Letras iguais não diferenciam pelo teste de Tukey a 5%.

Nessa tabela (3), conforme avaliados pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, foram obtidos 4 grupos estatisticamente diferentes, onde o grupo **a** é composto pelos fungos *P. formosus*, *A. tubingensis*; **b** composto por *P. formosus*, *A. tubingensis*; **c** composto por *A. tubingensis*, *P. formosus*, *P. parvisporus*, *M. circinelloides*, *A. novoparsiticus*, *A. fumigatus*, *F. proliferatum*; e **d** composto pelos fungos *P. formosus*, *P. parvisporus*, *M. circinelloides*, *A. novoparsiticus*, *A. fumigatus*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. brasiliensis*, *T. barzianum* e *F. fujikuroi*. Ainda na Tabela 3 é possível observar que os melhores fungos fazem parte do grupo **a** que, conforme o teste de Tukey empregado, não há diferença significativa entre eles.

Os fungos necessitam de uma fonte de carbono para o pleno desenvolvimento e assim produzir os seus metabólitos durante o crescimento fúngico. Esses compostos, a partir do metabolismo, podem ser extraídos e aplicados em vários ramos da biotecnologia, como as lipases, que podem ser biosintetizadas e ativadas por estes microrganismos. A observação da cinética durante o crescimento dos fungos em pesquisas demonstra que diferentes fontes de carbono podem ser utilizadas para a produção de lipases, como o óleo de soja, o glicerol e a glicose, onde foram obtidos resultados com alta eficiência de atividade lipásica (COSTA *et al.*, 2017).

O crescimento em várias fontes de carbono demonstra a plena capacidade que os fungos possuem de assimilarem estes compostos durante o seu desenvolvimento, sendo observados nas cepas fúngicas que foram capazes de assimilarem o azeite de oliva como única fonte de carbono neste estudo. O azeite demonstrou ser uma ótima fonte de carbono para a produção das enzimas lipases, Silva (2017) e Garcia (2011) demonstraram em estudos frequentes

a utilização desse substrato, em comparação com o óleo de soja como outra fonte alternativa, mostrando que o azeite pode apresentar maior eficiência conseguindo alcançar taxas superiores de produção das enzimas lipases. Essa assimilação com o azeite fez com que os fungos neste estudo produzissem maiores quantitativos proteicos e maiores taxas de enzimas lipases como observado anteriormente nas Tabelas 1, 2 e 3.

Comparando os resultados da Tabela 3 com os da Tabela 4, é possível observar alguns microrganismos produtores de lipases já estudados na literatura, que apresentam atividade lipolítica específica com resultados entre 0,1 a 5,9 U mg⁻¹.

Tabela 4. Atividades lipolíticas específicas em U mg⁻¹ presentes na literatura

Fungo/Bactéria	Cepa	Atividade específica de lipase (U mg ⁻¹)	Referências
<i>Aspergillus niger</i>	MYA 135	0,19	Garcia (2011)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	KKP 379	0,68	Kapturowska (2012)
<i>Candida rugosa</i>	-	5,9	Lopes (2016)

Quando comparados aos fungos do presente estudo, nota-se que o fungo *Paecilomyces formosus* (primeiro isolado) apresenta atividade lipolítica específica mais alta quando comparados aos demais microrganismos estudados nessa pesquisa, sendo superior aos microrganismos de referência encontrados na literatura, Tabela 4, com avaliação da taxa de produtividade na atividade específica de lipases usando *p*-NPB como substrato. Os três fungos neste estudo que apresentaram as mais altas taxas de produtividade na atividade específica de lipases ainda carecem de análises, sendo este estudo o primeiro relato de pesquisa sobre a capacidade de produzirem os mais altos níveis de enzima lipase.

Outro estudo apresentado demonstra que a afinidade da lipase em relação ao substrato também influencia na atividade específica, pois ela reage com os resíduos de aminoácidos no sítio catalítico, conseguindo catalisar ésteres de cadeias mais curtas ou mais longas. Esse estudo foi realizado por Freitas (2017) que demonstrou isso ao quantificar lipases de *Candida tropicalis*, cujo substrato *p*-NPB não apresentou atividade volumétrica, já ao utilizar o substrato laurato de *p*-nitrofenil (*p*-NFL) conseguiu-se obter 0,328 U mL⁻¹ de atividade volumétrica de lipases e, ao utilizar o *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NFP), obteve 0,065 U mL⁻¹.

Com isso, ao observar os resultados estatísticos, podemos inferir que houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$), ou seja, pelo menos um dos fungos apresenta diferença um do outro. Na Tabela 1 está demonstrada a quantidade geral de enzimas presentes no meio e esse resultado, em sua maioria, é inversamente proporcional aos resultados em quantidades de lipases presentes no meio, ou seja, existem vários tipos de proteínas que um microrganismo pode produzir, mas existem enzimas que são mais ativas em certos substratos.

As lipases possuem alta especificidade, podendo serem seletivas a determinadas posições em relação ao substrato que catalisará. Estas enzimas podem produzir algumas dessas reações insignificantes, resultando menor percentagem de conversão (KAPTUROWSKA *et al.*, 2012). Para que as lipases produzidas a partir de linhagens fúngicas se tornem mais específicas, elas precisam conseguir catalisar o substrato *p*-NPB, que possui uma menor cadeia de carbonos e assim conseguirem obter maiores valores de atividades lipolíticas específicas.

Os fungos com maiores atividades específicas de lipases, *P. formosus* I e II e *A. tubingensis*, não apresentaram diferenças significativas entre si, o fungo *P. formosus* é um fungo da classe endofítica, pertencente à família Eurotiaceae e ao filo Ascomycota, que pode ser encontrado no bagaço da cana-de-açúcar.

Este fungo foi relatado pela primeira vez no Brasil em 2016 (LOPES *et al.*, 2016), sendo então um fungo pouco estudado, que pode apresentar grande importância em processos bioindustriais, principalmente no estudo enzimático. O fungo *Aspergillus tubingensis*; apresentou também boa eficiência neste estudo, com resultados superio-

res em relação aos microrganismos descritos na Tabela 4, sendo apenas inferior ao fungo *Candida rugosa*, mas com resultados similares demonstrando que as atividades lipolíticas são altas e também promissoras para várias aplicações industriais.

Além disso, algumas espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. tubingensis* e *A. niger*, são conhecidas por serem capazes de produzirem enzimas celulases, responsáveis por catalisar a hidrólise de celuloses (PRAJAPATI *et al.*, 2018). O fungo *A. tubingensis* apresenta estudos com diferentes fontes de carbono, como galactose, glicose, glicerol e sacarose na otimização e produção de lipases e esterases, com produção máxima de lipases na presença de glicerol e poliuretano igual a $1,14 \mu\text{M min}^{-1}$, podendo ser observado que este fungo é capaz metabolicamente produzir altos níveis de enzimas lipases (KHAN *et al.*, 2017), conforme descrito no presente estudo.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fungos em estudo foram capazes de se desenvolverem e produzirem lipases utilizando o azeite de oliva como única fonte de carbono. Em especial o fungo *P. formosus* I (primeiro isolado), conseguiu produzir $8,004 \text{ U mg}^{-1}$ de lipases, seguido pelos fungos *P. formosus* II (segundo isolado) e *A. tubingensis*. E de acordo com literatura esses resultados são considerados elevados e com capacidade de serem aplicados em diversas aplicações na bioindústria, sendo também o primeiro relato científico destas enzimas lipolíticas produzidas por esses fungos.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, T. *et al.* Optimization of process variables for biodiesel production by transesterification of flaxseed oil and produced biodiesel characterizations. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 139, p. 1272-1280, 2019.
- ATALAH, J. *et al.* Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. **Bioresource Technology**, v. 280, p. 478-488, 2019.
- BRAGA, Adelaide Correia. **Biotransformação do óleo de rícino em aromas por *Yarrowia lipolytica***. 2009. 107f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biológica) - Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2009.
- BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 1-36, 30 set. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101368>
- CANET, A. *et al.* Exploring substrate specificities of a recombinant *Rhizopus oryzae* lipase in biodiesel synthesis. **New Biotechnology**, Barcelona, v. 39, p. 59-67, 25 out. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.003>
- COLLA, L. M. *et al.* Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus through* Solid-State and Submerged Fermentation. **BioMed research international**, v. 2015, p. 725959, 9 jun. 2015.
- COSTA, T. M. *et al.* Lipase Production By *Aspergillus Niger* Grown In Different Agro-Industrial Wastes By Solid-State Fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 419-427, abr. 2017.
- DANINO, H. *et al.* PPAR γ regulates exocrine pancreas lipase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 12, p. 1921-1928, 1 dez. 2016.
- FREITAS, M. F. M. **Produção De Lipases Por Leveduras Isoladas Do Bagaço De Caju Utilizando Fontes Alterna-**

- tivas De Carbono E Nitrogênio.** 2017. 104f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- GARCIA, A. K. **Avaliação da atividade lipolítica de fungos filamentosos da costa brasileira.** 2011. 56f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- KAJIWARA, S. *et al.* Development of sucrose-complexed lipase to improve its transesterification activity and stability in organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 121, p. 83-87, 2017.
- KAPTUROWSKA, A. U. *et al.* Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 1, p. 186-191, 1 jan. 2012.
- KHAN, S. *et al.* Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. **Environmental Pollution**, v. 225, p. 469-480, 1 jun. 2017.
- LOPES, L. V. *et al.* Primeiro relato da ocorrência de *Paecilomyces formosus* e *Paecilomyces parvisporus* no Brasil. **R. bras. Bioci.**, Porto Alegre, v. 14, n. 4, p. 215-224, out./dez. 2016.
- LORENZETTI, D. L. **Estudos De Aplicação De Lipases Em Formulações Cosméticas.** Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, 2007.
- MADAN, B.; MISHRA, P. Directed evolution of *Bacillus licheniformis* lipase for improvement of thermostability. **Biochemical Engineering Journal**, v. 91, p. 276-282, 15 out. 2014.
- NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger principles of biochemistry.** [S.l.]: W. H. Freeman and Company, 2013.
- OLIVEIRA, A. *et al.* Utilização de Resíduos da Agroindústria para a Produção de Enzimas Lipolíticas por Fermentação Submersa. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, n. 1, p. 19-26, 2013.
- OLIVEIRA, A. F.; BASTOS, R. G.; DE LA TORRE, L. G. *Bacillus subtilis* immobilization in alginate microfluidic-based microparticles aiming to improve lipase productivity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 143, p. 110-120, 15 mar. 2019.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 43-49, 1 mar. 2002.
- PRAJAPATI, B. P. *et al.* Characterization of cellulase from *Aspergillus tubingensis* NKBP-55 for generation of fermentable sugars from agricultural residues. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 733-740, 1 fev. 2018.
- RAOUFI, Z.; MOUSAVI, G.; SEYED, L. Biodiesel production from microalgae oil by lipase from *Pseudomonas aeruginosa* displayed on yeast cell surface. **Biochemical Engineering Journal**, v. 140, p. 1-8, 15 dez. 2018.
- RIOS, N. S. *et al.* Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 99-120, 2018.
- SAHAY, S.; CHOUHAN, D. Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 319-325, 2018.

SARDIN, S. M. *et al.* Dataset of differentially accumulated proteins in *Mucor* strains representative of four species grown on synthetic potato dextrose agar medium and a cheese mimicking medium. **Data in Brief**, v. 11, p. 214-220, nov. 2019.

SCHNEIDER, W. D. H. *et al.* Comparison of the production of enzymes to cell wall hydrolysis using different carbon sources by *Penicillium echinulatum* strains and its hydrolysis potential for lignocelulosic biomass. **Process Biochemistry**, v. 66, p. 162-170, 2018.

SILVA, T. C. **Tratamento de efluente oleoso de biodiesel por extrato bruto de lipase fúngica**. 2017. 106f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

TURATI, D. F. M. *et al.* Thermotolerant lipase from *Penicillium* sp. section *Gracilentia* CBMAI 1583: Effect of carbon sources on enzyme production, biochemical properties of crude and purified enzyme and substrate specificity. **Bio-catalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 15-24, 2019.