

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

SIMONE CRISTINE IZIDORO

Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases: potencial lipolítico de *Fusarium oxysporum* e da levedura L1

Guarapuava

2015

SIMONE CRISTINE IZIDORO

Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases: potencial lipolítico de *Fusarium oxysporum* e da levedura L1

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Profª. Dra. Adriana Knob.

Co-orientador: Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida.

Guarapuava

2015

Catálogo na Publicação

Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

I98i Izidoro, Simone Cristine
Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases: potencial lipolítico de *Fusarium oxysporum* e da levedura L1 / Simone Cristine Izidoro. -- Guarapuava, 2015
xiv, 126 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva, 2015

Orientadora: Adriana Knob
Co-orientador: Alex Fernandod e Almeida
Banca examinadora: Adriana Knob, Rosilene Rebeca, Ana Flora Vasconcelos

Bibliografia

1. Ciências biológicas. 2. Biologia evolutiva. 3. Enzimas lipolíticas. 4. Delineamento central composto rotacional. 5. Bioprospecção. 6. Substratos alternativos. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

CDD 589.2

Ficha de aprovação

*Aos meus pais Nilza e Natal,
Aos meus irmãos Valtenei, Deborah, Thais*
DEDICO.

Agradecimentos

Sem a esperança de dias melhores não haveria a finalização de etapas em nossas vidas, e agradeço a Deus o discernimento de minhas escolhas. Agradeço a Ele pelo dom da vida e pela oportunidade de me tornar mais sábia com seus ensinamentos diários.

Não existem palavras para demonstrar minha gratidão aos meus pais Natal e Nilza, que sempre me incentivaram a ser uma pessoa melhor a cada dia e por me permitir escolher ser responsável por aquilo que almejo em minha vida. Agradeço aos meus irmãos Thais, Deborah e Valtenei pela compreensão da minha ausência e pela torcida pela realização dos meus sonhos.

Meu muito obrigado ao meu noivo João Carlos, que com a sua sabedoria e paciência me ensinou que devemos lutar ativamente por aquilo que queremos. Agradeço por todo amor e dedicação que me dispensa sempre.

Especialmente agradeço a Professora Adriana Knob que acreditou em meu potencial, mesmo quando eu desacreditava. A ela devo todos os conhecimentos científicos que adquiri e aprendi que nada é impossível quando se ama o que está fazendo e que, os possíveis impecílios são degraus que nos tornam profissionais melhores. Agradeço ao Professor Vanderlei pela disponibilidade e paciência em todos os pedidos de ajuda. Agradeço ao Professor Alex pela inspiração no trabalho com lipases.

Agradeço as minhas amigas Maíra e Sônia por me inspirarem em dias que nada fluía. Também as minhas amigas Samara e Thaiane por todos os auxílios dispensados e também pelos sorrisos. Aos colegas de laboratório, Thaís, Márcio, Mariane, Maíra, Michael, Janaína, Carla pelos ensinamentos e convivência diária.

De uma maneira geral agradeço a todos os colegas do Mestrado e todas as pessoas que auxiliaram direta ou indiretamente de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos e pelo apoio financeiro concedido.

"Saindo do denso fumo, novamente em êxtase, vê exemplos de ira punida. Tornando a si, vê um anjo que está perto da escada do quarto compartimento. Os dois Poetas continuam a subir. Sobrevindo, porém, a noite, param e Virgílio explica ao discípulo que o amor é o princípio de todas as virtudes e de todos os vícios."

Canto XVII Purgatório, A Divina Comédia, Dante Alighieri.

Resumo

Devido a sua importância biotecnológica, um grande número de estudos envolvendo a produção de lipases por fungos tem sido desenvolvido nos últimos anos. O presente trabalho objetivou avaliar a produção de lipases por fungos isolados a partir de diferentes ambientes. O isolamento dos fungos foi realizado empregando-se a técnica de diluição sucessiva, permitindo a obtenção de 54 linhagens fúngicas. Destas, 56,37% corresponderam a linhagens leveduriformes, enquanto que 43,63% corresponderam a fungos filamentosos. A capacidade de produção de lipases foi evidenciada em todas as linhagens isoladas. No entanto, em presença de azeite de oliva, destacam-se os níveis de produção apresentados pelo isolado leveduriforme L1 (45,92 U/mL) e pelo fungo filamentoso *Fusarium oxysporum* (12,16 U/mL), ambos isolados a partir de óleo contaminado. Nos estudos envolvendo a produção de lipases pela levedura L1, maiores níveis de lipases foram obtidos ao se empregar o do soro de queijo como substrato, correspondendo a uma produção de 26,70 U/mL. Após a otimização empregando-se o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) aplicável à Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), os níveis de produção atingidos corresponderam a 267,07 U/mL. As melhores condições estabelecidas para a produção de lipases pela levedura L1 foram concentração do soro de queijo 1,1%, pH de cultivo 4,4 e tempo de cultivo de 24 horas. Adicionalmente, a linhagem de *F.oxysporum* foi selecionada para ser empregada nos estudos de otimização de lipases, empregando-se o DCCR e a MSR, em presença da casca de butiá. Os melhores níveis de produção foram obtidos quando a concentração da casca de butiá utilizada foi 2,9%, o pH do meio de cultivo ajustado para 4,2 e tempo de cultivo de 4,4 dias, correspondendo a 35,82 U/mL. A caracterização bioquímica das enzimas produzidas sob condições ótimas também foi conduzida, revelando que as lipases apresentam atividade ótima em pH neutro e a 45-50 °C, sendo altamente estáveis em pH neutro/alcalinos, bem como a 45°C. Em relação ao efeito de diversas substâncias sobre a atividade lipásica, verificou-se que tanto o β -mercaptoetanol na concentração de 10mM, quanto os íons Ca^{+2} a 2mM foram capazes de ativar estas enzimas. Ainda, um efeito ativador foi observado em presença dos surfactantes CTBA e SDS, revelando o potencial de aplicação dessas enzimas na indústria de detergentes. Contrariamente, as lipases foram inibidas por citrato de sódio, Mg^{+2} , Pb^{+3} e EDTA. Ao avaliar o efeito de diferentes solventes orgânicos sobre a atividade lipásica, observa-se que apenas o hexano a 20% apresentou um efeito ativador. Por fim, a atividade de esterificação das lipases de *F. oxysporum* sobre diferentes óleos vegetais foi avaliada. Maiores níveis de atividade foram observados quando o óleo de andiroba foi empregado, revelando o potencial de aplicação destas enzimas para a produção de biodiesel, a partir deste substrato. O emprego do soro de queijo e da casca de butiá como substratos para a produção de lipases se mostra bastante promissor, visto que tantos benefícios econômicos quanto ambientais poderão ser obtidos, a partir de sua utilização.

Palavras-chave: enzimas lipolíticas, delineamento central composto rotacional, bioprospecção, substratos alternativos.

Abstract

Due to their biotechnological importance, a great number of studies involving the fungal lipases production have been conducted in recent years. The present study aimed to evaluate the lipases production by fungus isolated from several habitats. The fungal isolation was conducted employing the successive dilution technique, allowing the achievement of 54 fungal strains. Of these, 56.37% corresponded to yeast strains, while 43.63% corresponded to filamentous fungi. The lipase production potential was evidenced for all the isolates. However, in the presence of olive oil, the highest levels of lipases were produced by the L1 yeast strain (45.92 U/mL) and by the filamentous fungi *Fusarium oxysporum* (12.16 U/mL), both isolated from contaminated oil. In relation to studies regarding the lipase production by the yeast L1, their potential of lipase production in presence of cheese residue was revealed, corresponding to 26.70 U/mL. In the studies involving the lipases production by the L1 yeast, high levels of lipases were obtained when cheese whey was used as substrate, corresponding to a production of 26,70 U/mL. After optimization, using Central Composite Rotatable Design (CCRD) applicable to Response Surface Methodology (RSM), the production levels achieved corresponded to 267,07 U/mL. The best conditions established for lipases production by L1 yeast were cheese whey concentration of 1.1%, pH of medium 4.4 and cultivation time of 24 hours. In addition, the *F. oxysporum* strain was selected in order to be employed in studies of optimization, using CCRD and RSM, in the presence of butia peel. The best lipase yields were obtained when the butia peel concentration was 2.9%, the pH of medium was adjusted to 4.2 and the cultivation time was 4.4 days, corresponding to 35.82 U/mL. The biochemical properties of enzymes produced under optimal conditions were also conducted, revealing that the lipases shown optimum activity in neutral pH and 45-50 °C, with high stability in neutral/alkaline pH values and 45 °C. Regarding the effect of several substances on lipase activity, it was observed that β -mercaptoethanol at 10 mM concentration, as well as the ions Ca^{2+} at 2mM concentration were able to activate these enzymes. Also, an activating effect was observed in the presence of surfactants CTBA and SDS, revealing the potential of these enzymes to be employed in detergent industries. Conversely, the lipases were inhibited by sodium citrate, Mg^{2+} , Pb^{3+} and EDTA. In relation to the effect of distinct solvents on lipase activity, it can be noted that only the hexane 20% showed an activating effect. Finally, the lipase esterification activity under different vegetable oils was evaluated. Higher activity levels were observed when the andiroba oil was used, revealing the application potential of these enzymes in biodiesel production from this substrate. The use of cheese whey and butia peel as substrates for lipases production appears to be very promising, since economic and environmental benefits can be obtained from their utilization.

Key words: lipolytic enzymes, central composite rotatable design, bioprospection, alternative substrates.

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

- Figura 1 - Hidrólise típica de um triacilglicerol por lipases 18
- Figura 2 - (A) Estrutura completa polipeptídica de lipase B produzida por *Candida antartica*. (B) Representação esquemática de uma α/β -hidrolase; setas azuis representam as folhas- β (1-8), cilindros vermelhos representam as α -hélices; círculos vermelhos representam as posições relativas dos aminoácidos da tríade catalítica. (C) representação esquemática da tríade catalítica na lipase A de *C. antartica*. 19
- Figura 3 - Tipos de reações catalisadas por lipases 20
- Figura 4 – Estrutura geral do gênero *Fusarium* sp. (A-C) macroconídios;(D) microconídios; (E) monofilíade, (F) polifilíade, (G-J) esporos..... 28
- Figura 5 - Micromorfologia e macromorfologia de *F. oxysporum* cultivado em ágar Sabouraud. (A) Macroconídio; (B) Microconídio; (C e D) filíades; (E) Macrocolônia. 30
- Figura 6 - Visualização gráfica de um planejamento composto central para (A) $q = 2$ fatores; (B) $q=3$ fatores..... 39

Capítulo 1

- Figura 1 - Seleção de linhagens de fungos filamentosos produtores de lipases inoculadas em meio líquido de Vogel suplementado com 10% de azeite de oliva. (A) Produção de lipases em U/mL. (B) Atividade específica em U/mg proteína. 70
- Figura 2 – Crescimento de linhagens fúngicas filamentosas produtoras de lipases quando crescidas em meio líquido de Vogel suplementado com 10% de azeite de oliva. 71
- Figura 3 - Seleção de fontes de carbono indutoras da atividade lipásica pela levedura L1. (A) Atividade lipásica (U/mL) em diferentes substratos; (B) Biomassa fúngica (mg)..... 72
- Figura 4 - Superfície de contorno para a produção de lipases pela levedura L1 cultivada em soro de queijo; (A) interação pH de cultivo [pH] x concentração do substrato [S]; (B) interação entre Tempo de cultivo [T] xS e (C) interação TxpH. 75

Capítulo 2

- Figura 1 - Espectro de infravermelho médio para as amostras de farelo de casca Butiá (*Butiaodorata*). As flechas apontam para os números de ondas de cada respectivo grupo orgânico funcional. 109
- Figura2 - Superfície de contorno para a produção de lipases por *F. oxysporum* cultivado em casca de butiá; (A) interação pH x S;(B) interação entre TxS e (C) interação TxpH... 113

Figura 3 - Efeito da temperatura(A) e termoestabilidade (B) das lipases produzidas pelo fungo <i>F. oxysporum</i>	114
Figura 4 - pH ótimo de atuação (A) e estabilidade frente ao pH (B) das lipases produzidas pelo fungo <i>F. oxysporum</i>	115
Figura 5 - Estabilidade das lipases produzidas por <i>F. oxysporum</i> frente a diferentes íons, substâncias(A) e surfactantes (B).	116
Figura 6- Atividade de esterificação frente a óleos de diferentes origens pela lipase produzida por <i>F. oxysporum</i>	118

LISTA DE TABELAS

Referencial teórico

Tabela 1- Linhagens fúngicas produtoras de lipases e seus respectivos locais de isolamento	24
Tabela 2–Produção de lipases por linhagens fúngicas distintas pertencentes ao gênero <i>Fusarium</i>	29
Tabela 3 - Melhores condições de cultivo estabelecidas para a produção de lipases por diferentes linhagens de <i>F.oxysporum</i>	31
Tabela 4 - Combinações entre os níveis A e B.	40

Capítulo 1

Tabela 1- Linhagens de fungos filamentosos e leveduriformes isolados a partir de diferentes ambientes.	66
Tabela 2 - Identificação ao nível de gênero das linhagens de fungos filamentosos isoladas de diferentes ambientes obtida por meio da análise de características macro e micromorfológicas (Chave de identificação de).	67
Tabela 3 - Índice enzimático das leveduras produtoras de lipases obtido por meio do teste de indução em placa em presença dos indutores azeite de oliva, Tween 20 e Tween 80. ...	68
Tabela 4 - Seleção de leveduras produtoras de lipases inoculadas em meio líquido de Vogel suplementado com 10% de azeite de oliva.	69
Tabela 5 - Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para produção de lipases pela levedura L1.	73
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão de lipases produzida pela levedura L1 cultivada em soro de queijo, e os valores de R ² e F-valor.	74

Capítulo 2

Tabela 1– Avaliação da influência de diferentes substratos sobre a produção de lipases e sobre o crescimento de <i>F. oxysporum</i>	108
Tabela 2 - Principais grupos funcionais presentes no farelo de casca Butiá (<i>Butiaodorata</i>) e suas faixas espectrais experimentais, por meio de infravermelho no modo DRIFTS. .	110
Tabela 3 - Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para produção de lipases por <i>F. oxysporum</i>	111
Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão de lipases produzida por <i>F. oxysporum</i> cultivado em casca de butiá, e os valores de R ² e F-valor.	112
Tabela 5- Efeito de diferentes solventes sobre a atividade lipásica de <i>F. oxysporum</i> ..	117

LISTA DE SIGLAS

β : Beta

°C: graus Celsius

FES: Fermentação em estado sólido

FSM: Fermentação submersa

g: grama

h: hora

M: molar

mg: miligrama

mg/mL: miligramas por mililitros

min: minutos

mL: mililitros

MSR: Metodologia de Superfície de Resposta

pH: Potencial hidrogeniônico

rpm: rotações por minuto

PNpp : *p*-nitronitrofenilpalmitato

PCoA: Análise de coordenadas Principais

SDS : dodecil sulfato de sódio

T ½ - meia vida

U: Unidade enzimática

U/mL: Unidades por mililitros

v/m: volume por massa

μL: microlitro

μmol: micromol

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 GERAL:	17
2.2 ESPECÍFICOS:.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 LIPASES: ESTRUTURA, AÇÃO E IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL	18
3.2 ISOLAMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE LIPASES.....	21
3.3 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR MICRORGANISMOS	25
3.4 O GÊNERO <i>FUSARIUM</i> E A ESPÉCIE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>	27
3.5 CONDIÇÕES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS: O EMPREGO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	32
3.6 A CASCA DE BUTIÁ	34
3.7 O SORO DE QUEIJO	36
3.8 O EMPREGO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR) COMO FERRAMENTA PARA A OTIMIZAÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
5. RESULTADOS	42
CAPÍTULO I- ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS LIPOLÍTICOS: USO DO SORO DE QUEIJO COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO.....	43
RESUMO	44
ABSTRACT	45
INTRODUÇÃO	46
MATERIAL E MÉTODOS.....	48
ISOLAMENTO DE FUNGOS A PARTIR DE DIFERENTES AMOSTRAS	48
IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS PELO USO DE MARCADORES MORFOLÓGICOS	48
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPÁSICA E DE PROTEÍNAS.....	49
SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASES	49
SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE LIPASES.....	50
SELEÇÃO DA MELHOR FONTE INDUTORA DE LIPASES PARA A LEVEDURA L1	50
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES UTILIZANDO DCCR E MSR EMPREGANDO-SE O SORO DE QUEIJO COMO SUBSTRATO.....	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
FUNGOS FILAMENTOSOS SELECIONADOS COMO PRODUTORES DE LIPASES	52
DETECÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE LIPASES	53
SELEÇÃO DA MELHOR FONTE DE CARBONO INDUTORA DE LIPASES PELA LEVEDURA L1	56
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES PRODUZIDAS PELA LEVEDURA L1 UTILIZANDO-SE O DCC E O MSR	57
CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS.....	59
FIGURAS E TABELAS	66
CAPÍTULO II- CASCA DE BUTIÁ (<i>BUTIA ODORATA</i>) COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO PARA A PRODUÇÃO DE LIPASES POR <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>	76
RESUMO	77
ABSTRACT	78
INTRODUÇÃO	79
MATERIAL E MÉTODOS	81
PREPARO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	81
CARACTERIZAÇÃO DA CASCA DE BUTIÁ POR INFRAVERMELHO	81
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPÁSICA E DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	81
MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	82
AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE LIPASES	82
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES UTILIZANDO O DCCR E A MSR, EMPREGANDO-SE A CASCA DE BUTIÁ COMO SUBSTRATO.....	82
CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA	83
ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO.....	84
RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
ESTABELECIMENTO DA MELHOR FONTE INDUTORA DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR <i>F. OXYSPORUM</i>	84
CARACTERIZAÇÃO DA CASCA DE BUTIÁ POR INFRAVERMELHO	86
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES EMPREGANDO-SE A CASCA DE BUTIÁ COMO SUBSTRATO.....	87
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS LIPASES PRODUZIDAS POR <i>F. OXYSPORUM</i>	89

<i>ESTABILIDADE DAS LIPASES DE F. OXYSPORUM FRENTE A DIFERENTES SOLVENTES</i>	93
ATIVIDADE DE TRANSESTERIFICAÇÃO	93
CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS	96
TABELAS E FIGURAS	108
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	119
7. REFERÊNCIAS	120

1. Introdução

Um dos maiores reservatórios de biodiversidade na Terra pertence ao mundo dos microrganismos. Os microrganismos desempenham funções essenciais, realizando processos ecológicos específicos que permitem a renovação contínua da vida de outros seres vivos do ecossistema e da biosfera. A diversidade microbiana representa um fator importante no desenvolvimento de alternativas sustentáveis, ao se pensar nas questões ambientais que o planeta Terra vem sofrendo. Apesar de toda a importância atribuída aos microrganismos, sua exploração ainda é ínfima diante da variabilidade de espécies que bactérias, fungos e algas representam.

Dada a heterogeneidade dos ambientes naturais e o alto potencial que os microrganismos apresentam, pesquisas relacionadas a descobertas de novas linhagens, produtos ou interações das quais eles façam parte são de fundamental importância para a ampliação do conhecimento e sua exploração. Uma maneira eficiente de estimular a descoberta de novos microrganismos é por meio da exploração de seu potencial produtor de enzimas e de compostos bioativos. Assim, o isolamento de novas linhagens vem despertando grande interesse, uma vez que a descoberta de novas espécies contribui não apenas para a obtenção de novos produtos de interesse biotecnológico, como também pode contribuir para o estudo da biodiversidade microbiana.

As enzimas são os produtos da síntese metabólica microbiana mais visados, constituindo um mercado mundial muito promissor, movimentando bilhões de dólares por ano. Dentre os microrganismos, os fungos filamentosos, bem como as leveduras, são os mais utilizados em pesquisas envolvendo a produção de enzimas, devido aos aspectos de sua morfologia, adaptação, atributos fisiológicos e bioquímicos. Nesse sentido, os fungos filamentosos são particularmente interessantes, por sintetizarem determinadas enzimas em quantidades expressivas, além destas serem facilmente recuperadas a partir do meio de cultivo.

As proteases, as carboidrases e as lipases são as enzimas mais estudadas. O interesse nestas últimas se justifica por apresentarem inúmeras aplicabilidades industriais e ecológicas. As lipases promovem a hidrólise de ésteres de triacilgliceróis constituídos de mais de dez átomos de carbono. Além da capacidade hidrolítica, as lipases destacam-se por apresentarem a capacidade de esterificação, transesterificação, aminólise e lactonização. Estas, por sua vez, são bastante interessantes para serem empregadas em vários segmentos industriais, bem como apresentam importância nas

interações ecológicas, como por exemplo no envolvimento de lipases em patogenias diversas, coevolução e outras interações.

Na literatura, inúmeras pesquisas com fungos filamentosos e leveduras produtoras de lipases são reportadas. Entretanto, ainda existe muito a se descobrir, incluindo novas linhagens que produzam eficientemente essas enzimas, bem como que produzam enzimas com propriedades bioquímicas diferenciadas.

Diante da necessidade de se isolar novos microrganismos produtores de enzimas lipolíticas e da importância industrial destes catalisadores, a presente pesquisa visou o isolamento de fungos potencialmente produtores de lipases a partir de diferentes habitats. Após a seleção das melhores linhagens produtoras, o efeito de diferentes condições de cultivo dos isolados L1 e *Fusarium oxysporum* foi avaliado, a fim de se elevar os níveis de lipases produzidas. Ainda, as propriedades bioquímicas das lipases produzidas por *F. oxysporum* foram investigadas, para a inferência de possíveis aplicações industriais para estas enzimas.

2. Objetivos

2.1 Geral:

O objetivo geral do presente estudo foi isolar espécies fúngicas potencialmente produtoras de lipases a partir de diversos ambientes, bem como estabelecer as melhores condições de cultivo que favorecem a produção dessas enzimas pelas melhores linhagens produtoras.

2.2 Específicos:

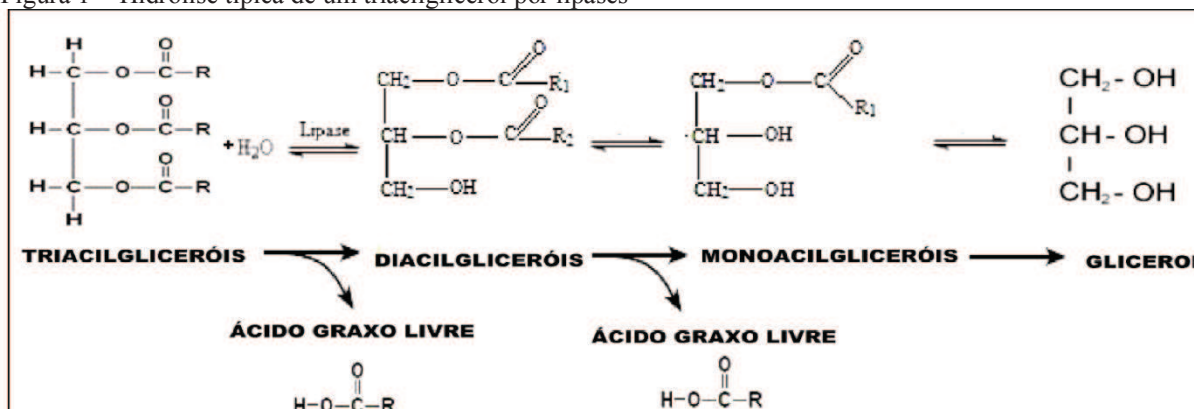
1. Isolar, identificar e avaliar o potencial de linhagens de fungos quanto à capacidade de produção de lipases;
2. Avaliar o efeito de diferentes substratos puros e resíduos agroindustriais sobre a produção de lipases pelas linhagens previamente selecionadas;
3. Estabelecer os parâmetros físico-químicos ótimos para a produção de lipases pela linhagem L1, utilizando o delineamento central composto rotacional aplicável à metodologia de superfície de resposta;
4. Estabelecer os parâmetros físico-químicos ótimos para a produção de lipases pelo fungo *F. oxysporum*, utilizando o delineamento central composto rotacional aplicável à metodologia de superfície de resposta;
5. Determinar o pH e a temperatura ótimos da atividade enzimática, bem como verificar a estabilidade das lipases produzidas por *F. oxysporum* frente à temperatura e ao pH;
6. Avaliar o efeito de íons metálicos, solventes e surfactantes sobre a atividade das lipases produzidas por *F. oxysporum*;
7. Verificar o potencial de aplicação das lipases de *F. oxysporum* por meio da detecção da atividade de esterificação.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Lipases: estrutura, ação e importância industrial

As lipases (EC3.1.1.3) são enzimas ubíquas multifuncionais que, dentre uma de suas funções, apresenta a capacidade de hidrolisar triacilgliceróis de cadeia longa (constituídos por mais de 10 átomos de carbono), liberando diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol (Figura 1). Essa capacidade confere às lipases uma enorme aplicabilidade em diferentes segmentos industriais. Desde a década de 1980, o número de lipases comerciais tem aumentado significativamente, emergindo como um dos principais biocatalisadores, representando uma parcela significativa do mercado multibilionário de enzimas (TREICHEL et al., 2009; NOVOZYMES, 2011).

Figura 1 - Hidrólise típica de um triacilglicerol por lipases



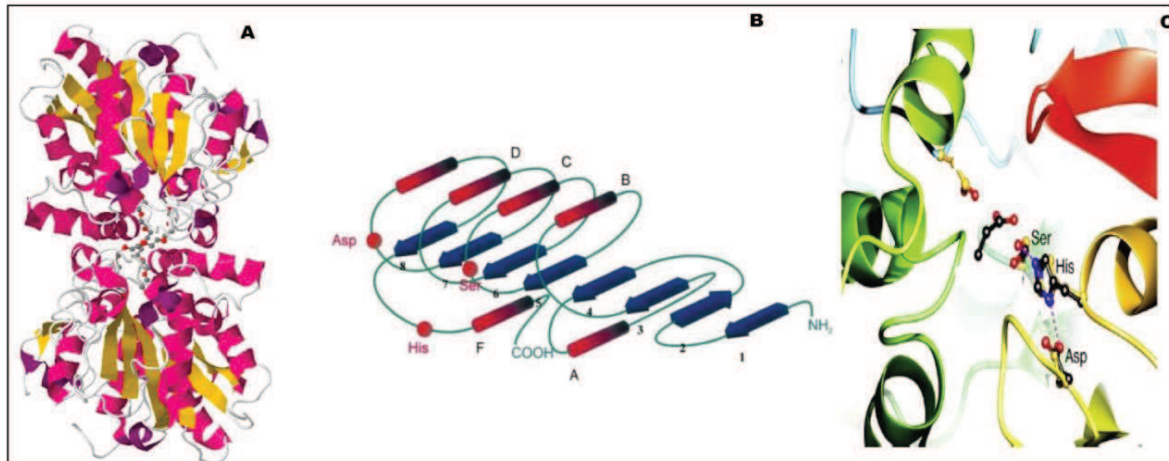
Fonte: adaptado de Castro et al., 2004.

As enzimas lipolíticas são facilmente encontradas em todos os seres vivos, podendo ser obtidas principalmente a partir de animais (pancreáticas, hepáticas e gástricas), vegetais e de microrganismos (YANG et al., 2005). A produção de lipases por microrganismos (fungos, algas e bactérias) vem sendo reportada em diversos estudos ao longo dos anos, devido a versatilidade de suas propriedades em relação a atuação enzimática, especificidade ao substrato e facilidade de manutenção e cultivo desses organismos (SHARMA e KANWAR, 2014).

As lipases pertencem ao grupo das hidrolases, juntamente com as esterases. Porém, diferentemente destas últimas, as lipases catalisam a reação de ácidos graxos de cadeia longa. Dentre as hidrolases, as lipases pertencem ao grupo estrutural das α,β -hidrolases, constituído por serino-hidrolases. Este grupo inclui enzimas em que a

atividade depende principalmente da tríade catalítica constituída por serina-histidina-aspartato/glutamato, os quais são encontrados em uma região altamente conservada, sendo normalmente recoberta por uma "tampa" ou "lid" com característica anfipática. Quando essa tampa interage com a superfície lipídeo/água, a mesma sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. Conseqüentemente, o substrato pode ligar-se à enzima (ILLANES, 2008). É nesta região da tríade catalítica (Figura 2 B e C) que ocorre o ataque nucleofílico do oxigênio constituinte da serina ao átomo de carbono da ligação éster do substrato. Desta forma, o intermediário tetraédrico acil-enzima é formado, sendo este estabilizado por ligações de hidrogênio com os resíduos de oxianion (oxigênio carbonílico negativamente carregado). Posteriormente, o álcool é liberado e o complexo acil-lipase é hidrolisado. Os ácidos graxos, bem como a enzima em sua forma livre são liberados, encerrando-se, assim, o ciclo catalítico (ALMEIDA et al., 2013; PACHECO, 2012).

Figura 2 - (A) Estrutura completa polipeptídica de lipase B produzida por *Candida antarctica*. (B) Representação esquemática de uma α/β -hidrolase; setas azuis representam as folhas- β (1-8), cilindros vermelhos representam as α -hélices; círculos vermelhos representam as posições relativas dos aminoácidos da tríade catalítica. (C) representação esquemática da tríade catalítica na lipase A de *C. antarctica*.

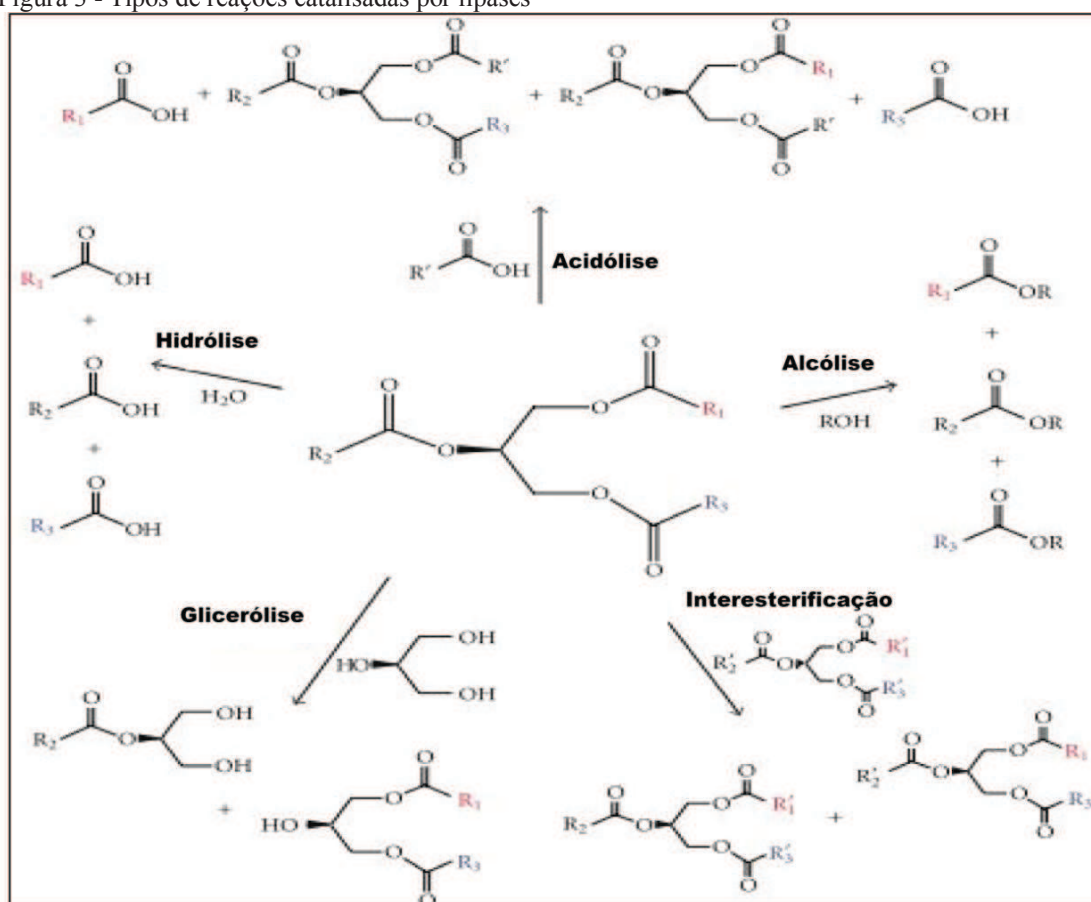


Fonte: (KIM et al., 2014; Protein Data Bank; BORNSCHEUER, 2002; ERICSSON et al., 2008).

Além da classificação já destacada, as lipases também subdividas em alguns grupos. Lipases regioseletivas são divididas em dois tipos: as não-específicas e as lipases 1,3-específicas. As lipases não-específicas hidrolisam os ésteres de ácidos graxos primários, ou seja, na posição 1 ou 2. Já as 1,3-específicas hidrolisam apenas ésteres na posição 1 ou 3; as lipases tipo-seletivas estão relacionadas com o tamanho da cadeia carbônica do triacilglicerol; as lipases enantiosseletivas tem a capacidade de formar componentes enantiômeros específicos (ALMEIDA et al., 2012).

Essas macromoléculas podem apresentar a capacidade de esterificação, interesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise, as quais são características especiais para determinadas aplicações industriais e que ocorrem em condições mínimas de água do meio reacional (SHARMA; KANWAR, 2014). A atividade de esterificação (Figura 3) é uma função que as lipases exercem e que vem ao longo dos anos sendo altamente visada para aplicações específicas dessa enzima. Nesse processo, a lipase tem a capacidade de reverter o processo de hidrólise, podendo catalisar reações de transesterificação (interesterificação, alcoólise e acidólise), síntese de amidas e lactonização (PAQUES e MACEDO, 2006; COLLA et al., 2012).

Figura 3 - Tipos de reações catalisadas por lipases



Fonte: (RIBEIRO et al, 2011).

Segundo Hasan et al. (2010), enzimas lipolíticas podem ser aplicadas na indústria de detergentes, promovendo a hidrólise de óleos e gorduras, aumentando a capacidade de limpeza desses produtos. Nesse caso, a enzima deve atuar em condições de lavagens, devendo ser termoestável e capaz de permanecer ativa em meio alcalino (pH de 10 a 11), bem como em temperaturas de 30 °C a 60 °C. Além disso, deve apresentar uma baixa especificidade pelo substrato e ser estável em presença de outros

compostos constituintes dos detergentes, como benzeno, sulfonatos e proteases (COLLA et al., 2012).

No tratamento de efluentes, as lipases também têm sido utilizadas, sendo recentemente empregadas como alternativa ao tratamento convencional de efluentes em função das vantagens apresentadas, como facilidade de manipulação e não oferecer perigos nem a saúde humana, nem ao meio ambiente (BASHEER et al., 2011; VERMA et al., 2012). A presença de óleos e gorduras em águas residuárias de indústrias de processamento de alimentos como laticínios, abatedouros, e cervejarias causam problemas em todas as etapas do tratamento de seus efluentes. Elevadas concentrações de lipídeos resultam na formação de lodos com diferentes características físicas e reduzida atividade hidrolítica devido à flotação dessa biomassa, aumento do tempo de retenção hidráulica desses efluentes nas lagoas de estabilização, redução da capacidade de aeradores e elevada demanda de produtos flocculantes (MENDES et al., 2005; VALLADÃO et al., 2011).

As lipases também são utilizadas na indústria alimentícia, como na hidrólise da gordura do leite, auxiliando na maturação de queijos e na formação de manteiga. Na panificação, auxiliam na obtenção de flavonóides, os quais conferem durabilidade aos alimentos. Ainda, sua capacidade de transesterificação proporciona a obtenção de alimentos com apelo nutricional, bem como a fabricação de manteiga de cacau, margarinas, entre outros (SHARMA et al., 2001; KIM et al., 2006; LARIOS et al., 2004).

Na química fina, as lipases também apresentam um papel importante, atuando na construção de blocos quirais, na produção de lipídeos específicos e como enzimas digestórias e emulsificantes (BAJAJ et al., 2010). Pesquisas atuais vêm sugerindo a aplicação de lipases na produção de biodiesel, sendo que esse processo vem se tornando uma tendência para a substituição de vias químicas. Neste caso, seu emprego representa um menor custo na produção do biodiesel. Ainda, as reações de transesterificação catalisadas pelas lipases permitem a obtenção de elevados teores de ésteres metílicos ou etílicos e a glicerina produzida por este tipo de processo apresenta uma pureza mais elevada (MESSIAS et al., 2011).

3.2 Isolamento de fungos produtores de lipases

Na natureza, estima-se que exista mais de um milhão de espécies de fungos, sendo que apenas 5% dessas espécies foram descritas até hoje. Uma vez que as espécies já descritas compreendem microrganismos de grande importância biotecnológica, sugere-se que o isolamento de novas linhagens possa culminar na obtenção de resultados particularmente interessantes, tanto do ponto de vista ecológico, quanto biotecnológico (RUEGGER, 2001). Os fungos são cosmopolitas, exibindo uma notável capacidade de utilizar-se de quase todas as fontes de carbono como nutrientes. Devido a esse fato, podem ser isolados dos mais diferentes ambientes. A grande maioria dos fungos pode ser encontrada em ambientes terrestres, aquáticos, colonizando lugares naturais ou sintéticos, decompondo substratos complexos e transformando-os em componentes químicos simples (RUEGGER, 2001).

Normalmente, estudos relacionados a produção de diversas substâncias microbianas envolvem linhagens adquiridas de coleções de cultura ou isoladas a partir de nichos naturais (COLEN, 2006). Segundo Ogawa et al. (1999), o isolamento e a seleção são os meios mais eficientes para a detecção de novas enzimas, o que é consequência da diversidade de microrganismos existentes e da versatilidade das enzimas produzidas. A linhagem é o fator determinante no processo fermentativo, sendo que esta deve apresentar características que a tornem atrativa, como ser de fácil cultivo e manutenção, ter um bom rendimento na produção e não ser, preferencialmente, patogênica (COLEN, 2006).

A capacidade de sobrevivência e a adaptabilidade dos microrganismos a diferentes ambientes são determinados pelo próprio ambiente, sendo influenciadas direta ou indiretamente por fatores distintos. A produção de enzimas extracelulares é uma resposta a determinados estímulos ambientais, pela expressão de genes e posterior secreção das enzimas formadas, estando a síntese destas enzimas sujeita a mecanismos regulatórios passíveis de indução e repressão (COLEN, 2006).

Linhagens fúngicas capazes de sintetizar lipases podem ser encontradas em vários habitats. Normalmente, parte-se da hipótese que alguns lugares são preferenciais para encontrar uma maior diversidade de microrganismos produtores dessas enzimas. Locais que contenham ácidos graxos de uma maneira geral, como por exemplo efluentes de indústrias alimentícias, abatedouros, locais de produção de alimentos e solos contaminados com resíduos de óleos vegetais são comumente explorados nesse sentido (SHARMA et al., 2001; ABD RAHMAN et al., 2007).

O isolamento e a identificação de novas fontes microbianas são de grande

interesse, pois além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais (ALVES et al., 2002). De acordo com Rodrigues (2011), o conhecimento sobre a diversidade de microrganismos capazes de sintetizar lipases é um ponto crucial para essas novas descobertas.

Diferentes estratégias de ação para o isolamento de fungos produtores de lipases devem ser consideradas, para que se alcance o sucesso e o objetivo da pesquisa. Segundo Steele e Stowers (1991), alguns elementos-chave que definem os passos a serem tomados tanto no isolamento, quanto na seleção de fungos produtores de lipases devem ser considerados. O primeiro passo é o desenvolvimento de protocolos eficientes para o isolamento de determinados microrganismos, bem como atenção na fonte desse microrganismo; após a obtenção das culturas puras é necessário realizar o rastreamento primário e a análise quantitativa da produção de lipases; após a eliminação dos não produtores, o rastreamento secundário deve ser realizado, o qual vem a ser a análise qualitativa dos melhores produtores de lipases, dentre os organismos selecionados.

Nos últimos anos, muitos estudos envolvendo o isolamento de fungos filamentosos produtores de lipases tem sido realizados no mundo inteiro (Tabela 1). Couto et al. (2014) isolaram 22 espécies de fungos filamentosos de grãos de café, sendo a maior parte destas pertencente ao gênero *Aspergillus*. Em seu estudo, 10 espécies foram capazes de produzir lipases. Ao estudarem fungos filamentosos isolados de efluentes de laticínios, Roveda et al., (2010) detectaram a presença de 21 espécies pertencentes a quatro gêneros distintos, destacando-se os níveis de lipases produzidos por um fungo do gênero *Aspergillus* (12,5 U/mL) e um do gênero *Penicillium* (20,42 U/mL). Rodrigues (2011) isolou e identificou um total de 113 fungos produtores de lipases de diversos ambientes, pertencentes a 14 gêneros diferentes. Porém, 13 destes fungos eram leveduras e não foram identificadas ao nível de gênero. Fungos dos gêneros *Fusarium* sp. e *Acremonium* sp. isolados por Brito (2012) destacaram-se em relação ao seu potencial de produção de lipases, apesar de espécies desses gêneros raramente serem consideradas lipolíticas.

Apesar da maior parte dos estudos reportarem a produção de lipases por fungos filamentosos (TREICHEL et al., 2009), as leveduras também têm se mostrado promissoras nesse sentido. A levedura *Mycotorula lipolytica* foi a primeira levedura registrada na literatura como boa produtora de lipases (PETERS e NELSON, 1948). Sabe-se que alguns gêneros são melhores produtores do que outros, destacando-se as

espécies de *Candida*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Torulopsis* e *Yarrowia* (RODRIGUES, 2011). Porém, novas linhagens produtoras de lipases que não haviam sido reportadas anteriormente na literatura foram recentemente descobertas, tais como as leveduras *Pichia lynferdii* (KIM et al., 2010), *Pseudozyma hubeiensis* (BUSSAMARA et al., 2010) e *Cryptococcus* spp. (LIN et al., 2006).

Tabela 1- Linhagens fúngicas produtoras de lipases e seus respectivos locais de isolamento

Fungo	Local de isolamento	Autor
<i>Yarrowia lipolítica</i>	Polpa de Pequi, solo enriquecido com polpa de abacate;	GONÇÁLVEZ et al., 2007
300 leveduras isoladas, 6 linhagens ótimas produtoras(M1-6); M1(<i>Y. lipolítica</i>)	Águas residuais de Isfahan, Irã.	MAFAKHER et al., 2010
32 espécies entre os gêneros: <i>Aspergillus</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Mucor</i> .	Amostras de solo da cidade de Bangalore, Índia	SAVITHA et al., 2007
21 espécies entre os gêneros: <i>Aspergillus</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Trichoderma</i> ; <i>Fusarium</i> .	Efluentes de laticínios da cidade de Passo fungo, RS, Brasil;	ROVEDA et al., 2010
<i>Fusarium solani</i>	-Vísceras de peixes coletadas no lago de Dali, na China	LIU et al., 2009
6 espécies dentre os gêneros: <i>Rizopus</i> ; <i>Mucor</i> ; <i>Penicillium</i>	Castanha-do-pará, Fezes de Bizão, Fezes de cavalo, Azeite de oliva	SILVA et al., 2009
<i>Aspergillus</i> ; <i>Fusarium</i> ; <i>Geotrichum</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Rizopus</i>	Solo do sudoeste do Brasil, Frutas sudoeste do Brasil	FREGOLENTE, et al., 2009
<i>Alternaria</i> ; <i>Aspergillus</i> ; <i>Beauveria</i> ; <i>Botrytis</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Colleototrichum</i> ; <i>Fusarium</i> ; <i>Geotrichum</i> ; <i>Mucor</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Rizomucor</i> ; <i>Rizopus</i> ; <i>Trichoderma</i> ; <i>Verticillium</i> .	Tecidos vegetais necrosados (banana, limão, mamão, manga, folhas de oti), insetos entomopatogênicos (formiga saúva, lagarta da goiabeira, lagarta do cartucho de milho, moleque da bananeira, gorgulho do milho, boca do cafeeiro, cigarrilha)	RODRIGUES, 2011
<i>Fusarium</i> ; <i>Acremonium</i> .	Caixa de gordura de residências da cidade de São José do Rio Preto e Ilha solteiro-SP- Brasil, Sementes de oleaginosas, Estação de tratamento de resíduos de curtume	BRITO, 2012
<i>Penicillium</i> ; <i>Aspergillus</i>	-Efluente de abatedouro de frango em Santa Catarina-Brasil	PACHECO, 2012
<i>Aspergillus</i> ; <i>Fusarium</i> ; <i>Penicillium</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Colleototrichum</i> ; <i>Epicoccum</i> ; <i>Gliocladium</i> ; <i>Rizopus</i> ; <i>Trichoderma</i>	Grãos de Café	COUTO et al., 2014

Kumar e Gupta (2008) isolaram 15 leveduras em áreas de lodo e contaminadas com óleo em Delhi, na Índia. Dentre as linhagens leveduriformes, uma linhagem de *Trichosporum* sp. foi selecionada para estudos posteriores, por apresentar um maior halo de lipólise. Ao avaliarem o azeite de oliva recém produzido, Ciafardini et al. (2006) notaram que o mesmo apresentava uma rica microbiota fúngica. Dentre os microrganismos detectados estavam várias leveduras identificadas posteriormente como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida wickerhamii*, *Williopsis californicae* *Candida boidinii*. Dentre estas linhagens, *S. cerevisiae* e *W. californica* apresentaram um bom potencial de produção de lipases. Em um estudo envolvendo uma pré-seleção de 16 leveduras, Kim et al. (2010) selecionaram a linhagem *Pichia lynferdii* Y-7723 como ótima produtora de lipases.

3.3 Determinação da produção de lipases por microrganismos

Devido a alta aplicabilidade das enzimas, diversos métodos de detecção de atividade são elaborados a cada ano, a fim de simplificar o processo, bem como possibilitar um aumento no rendimento das enzimas produzidas. A seleção do substrato adequado é crucial para um ensaio de atividade de lipases, uma vez que essas enzimas apresentam diferentes formas de atuação (SANDOVAL e MARTY, 2007; TENG e XU, 2007).

Ensaio realizados envolvendo a seleção de microrganismos produtores de lipases são específicos, necessitando de atenção especial para o crescimento microbiano, produção e liberação da enzima, atividade e especificidade ao substrato e sensibilidade do teste de detecção da atividade (SHELLEY et al., 1987; BEISSON et al., 2000). De acordo com Almeida (2012), os métodos são relativamente simples, sendo divididos em quantitativos e qualitativos.

Os métodos qualitativos ou indiretos são aqueles em que um indicador é usado ou então uma mudança no substrato é observada, devido a hidrólise por parte da enzima. Já os diretos ou quantitativos são métodos que utilizam a hidrólise de um substrato sintético e possibilitam a quantificação do produto final liberado (ALMEIDA et al., 2012).

No método qualitativo, a lipólise é diretamente observada pela alteração na aparência do substrato. Neste caso, diferentes substratos como a tributirina, triolina,

tween 20 ou 80, azeite de oliva, entre outros são empregados, os quais são homogeneizados em um meio de cultura sólido que é vertido em placa de Petri. A produção da lipase é então detectada pela zona clara formada ao redor da colônia. A quantificação da enzima é então determinada através da relação linear entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo lipolítico, possibilitando determinar o índice enzimático para aquele microrganismo produtor. Corantes indicadores também são utilizados nessa técnica, sendo que o resultado é observado após a mudança de coloração em que o pH do meio reacional é alterado devido a liberação dos ácidos graxos. Normalmente, para este fim, os indicadores victoria blue, spirit blue, azul de nilo, vermelho de fenol, rodamina B, entre outros são utilizados. (HASAN; et al., 2009; MESSIAS et al., 2011; SRIMHAN et al., 2011).

Para uma detecção rápida, os métodos qualitativos são preferenciais, porém, alguns cuidados devem ser observados. Por exemplo, a acidificação do meio pode ocorrer não apenas pelos ácidos graxos liberados pelas lipases, mas sim devido a geração de outros metabólitos ácidos, os quais geram resultados falso-positivos (ALMEIDA, 2012).

Os métodos quantitativos ou diretos são meios em que o substrato sintético ou natural é hidrolisado. Existem diferentes maneiras de se observar a hidrólise do substrato pela lipase. Um desses métodos é a titulometria, em que a liberação de ácidos graxos em decorrência da ação lipolítica é detectada pela adição de NaOH e um indicador. Além de constatar a produção de lipases pelo microrganismo, essa técnica também é utilizada para avaliar a capacidade de esterificação.

Outro método amplamente utilizado é o espectrofotométrico. Neste caso, um substrato cromogênico é empregado. O cromóforo liberado a partir deste último gera um produto colorido, o qual é analisado em um determinado comprimento de onda (HASAN et al., 2009). No caso da investigação de lipases, o substrato mais utilizado é o palmitato de *p*-nitrofenila. Após sua hidrólise, um ácido palmítico e um *p*-nitrofenol são liberados, sendo este último mensurado em espectrofotômetro a 400-410 nm (GILHAM e LEHNER, 2005). Outros substratos também são comumente utilizados, como α e β -naftil, resorufina, 2,4-dinitrofenol, *p*-nitrofenil miristato, *p*-nitrofenil laurato, *p*-nitrofenil butirato, tributirina e triolina (HASAN et al., 2006, 2009).

Os zimogramas também podem ser utilizados para a detecção da atividade lipolítica, especialmente quando muitos microrganismos são avaliados. Entretanto, sua utilização não é recomendada, pois encarece o processo de seleção inicial. Segundo

Gurung et al. (2013), a escolha do método para a seleção dos microrganismos produtores deve ser criteriosamente analisada, uma vez que deve atender os objetivos do trabalho.

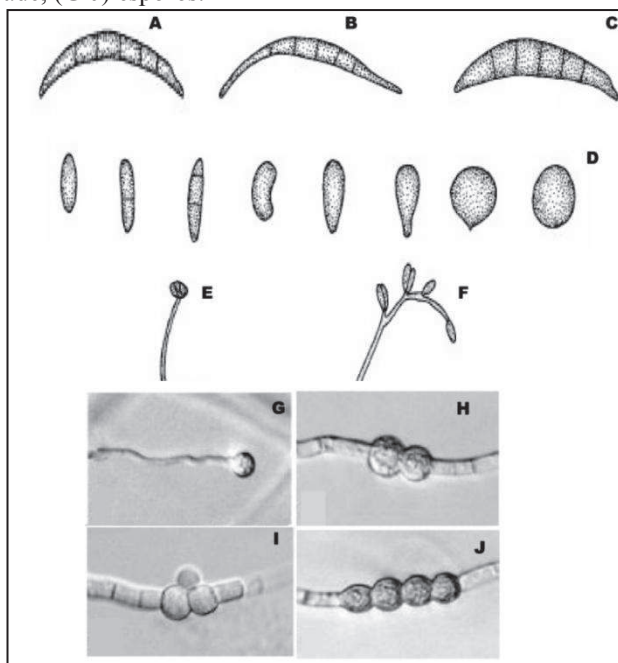
3.4 O gênero *Fusarium* e a espécie *Fusarium oxysporum*

Os fungos filamentosos do gênero *Fusarium* são cosmopolitas, podendo ser encontrados nos mais diversos ambientes, como solo, plantas, alimentos e outros, ocorrendo predominantemente em regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas. Esses fungos exibem um grau notável de biodiversidade em relação às suas características morfológicas, fisiológicas e ecológicas. Assim, nota-se que os representantes desse gênero podem ocorrer numa vasta gama de nichos ecológicos (BURGUESS et al., 1994; BURGUESS e SUMMERELL, 2000; MARTINS, 2005).

As descrições para a identificação clássica de *Fusarium* spp. se baseiam no uso de meios de cultura específicos e condições de cultura (crescimento micelial, pigmentação, estruturas reprodutivas e esporulação). Segundo Leslie e Summerell, (2006), as espécies do gênero *Fusarium* apresentam algumas características específicas, que auxiliam em sua identificação. Um caráter importante nesse sentido são as formas dos macroconídios e microconídios. Os macroconídios podem apresentar três formas básicas: a) retos com aparência de agulha; b) com curvatura dorsiventral; c) macroconídios com lado superior mais curvo que o lado inferior, ou seja, em formato de banana (Figura 4A-C). Estes últimos são bastante característicos para o gênero, porém não são exclusivos em relação às suas espécies (SEIFERT, 2003).

A produção de microconídios é pronunciada em todas as espécies de *Fusarium*, apresentando formas bastante diversificadas, incluindo oval, reniforme, piriforme, esférica ou fusiforme (Figura 4-D). Os conidióforos são de dois tipos básicos, simples (monofialídes) ou ramificados (polifialídes) (Figura 4E-F). Quando simples, as células apresentam apenas um septo, enquanto que, quando ramificados, podem apresentar um ou mais septos. Nesse último caso, a produção de aglomerados de esporos no final das filíades pode ser verificada, os quais lembram superficialmente cabeças de esporos, podendo ser confundidos com as espécies do gênero *Aspergillus*. Outra característica relevante no gênero são os esporos que podem apresentar-se isoladamente, aos pares, em tufos ou em cadeias (Figura - G-J) (BURGESS et al., 1994; NELSON et al., 1983; LESLIE e SUMMERELL, 2006).

Figura 4 – Estrutura geral do gênero *Fusarium* sp. (A-C) macroconídios; (D) microconídios; (E) monofilíade, (F) polifilíade, (G-J) esporos.



Fonte: adaptado de LESLIE e SUMMERELL (2006).

Características secundárias, como a pigmentação, tipo de micélio, formação de escleródios, taxa de crescimento pelo diâmetro da colônia, metabólitos secundários e micotoxinas também são utilizadas na identificação de espécies pertencentes ao gênero *Fusarium* (LESLIE e SUMMERELL, 2006).

Dentro do gênero, a produção de enzimas é altamente explorada, seja pela procura de novas enzimas de interesse biotecnológico, ou pela compreensão ecológica nas quais elas fazem parte. Um grande número de pesquisas realizadas com a produção de lipases por fungos do gênero *Fusarium* é encontrada na literatura (Tabela 2), sendo que as suas espécies são conhecidas por produzirem lipases que apresentam propriedades interessantes, tais como estabilidade em solventes orgânicos polares como o etanol, acetona e n-propanol (CAMARGO-DE-MORAIS et al., 2003).

Muitos trabalhos relatam espécies de *Fusarium* intimamente associadas às plantas, atuando como fitopatógenos. Isso pode justificar o fato dessas espécies produzirem lipases, uma vez que alguns autores já destacaram o papel das lipases como um importante fator de virulência ligado ao mecanismo de infecção em alguns cereais e plantas (VOIGT et al., 2005). Ainda, estas espécies produzem uma grande variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos, apresentando uma diversidade química extraordinária (MORETTI, 2009).

Tabela 2–Produção de lipases por linhagens fúngicas distintas pertencentes ao gênero *Fusarium*.

Linhagem	Indutor	pH	Temperatura em °C	Atividade	Referência
<i>F. culmorum</i> <i>F. decemcellulare</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. moniliforme</i> <i>F. sambucinum</i> <i>F. semitectum majus</i> <i>F. subglutinans</i> <i>F. tricinetum</i>	1% (v/v) Tween 80	9,2	37	3 U/mg, 600 U/mg, 3 U/mg, 210 U/mg, 3 U/mg, 110 U/mg, 3 U/mg, 28 U/mg	García-Lepe et al.,1997
<i>F. solani</i> FS1	0,5% (v/v) azeite de oliva	7,6-8,6	25	10,5 U/L	Maia et al., 1999
<i>F. solani</i>	1% (v/v) azeite de oliva	10	30	605 U/mL	Liu et al.,2009
<i>F. solani</i> SKWF7	Óleo de palma	8,0	40	73,3 U/mL	Kanmani et al., 2012
<i>G. fujikuroi</i> FCLA-MA41	Resíduo de abatedouro de frango + Triton x-100	7,2	28	6,87 U/mL	Oliveira et al., 2014
<i>F. globulosum</i>	Óleo de neem	6,2	25	12,56 U/mg	Gulati et al., 2005

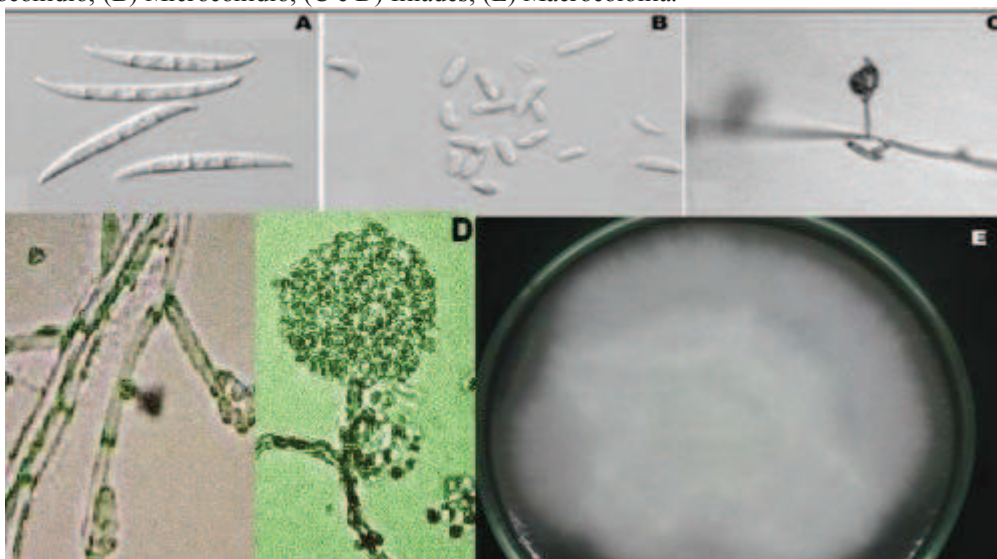
Recentemente, o telomorfo *Gibberella fujikuroi* FCLA-MA41 (*Fusarium sp.*) foi isolado de uma planta em decomposição da Mata Atlântica no Estado de São Paulo, Brasil, por Oliveira e colaboradores (2014) e testada quanto a produção de lipases utilizando o resíduo de abatedouro de frangos como substrato. O cultivo foi realizado em fermentação submersa contendo Triton x-100, resíduo de frango e extrato de levedura e aplicado ao Delineamento Central Composto (DCC), apresentando, desta forma, três fatores de interação. Por meio dos estudos de otimização, os autores obtiveram uma atividade lipásica correspondente a 6,87 U/mL pelo referido fungo (OLIVEIRA et al., 2014).

Outro exemplo recente do emprego de fungos do gênero *Fusarium* na produção de lipases é o estudo de Liu et al. (2009), envolvendo a linhagem *F. solani* N4-2 isolada a partir de vísceras de peixe do Lago Dali, na China. Após otimização da produção

destas enzimas em cultivo submerso suplementado com azeite de oliva, os níveis de lipases corresponderam a 605,15 U/mL. Os autores sugeriram um potencial de aplicação destas enzimas em indústrias de detergentes, visto que essas lipases apresentaram-se altamente estáveis em pH alcalino.

F. oxysporum é uma espécie com ampla distribuição geográfica, podendo ser sapróbia de solos, de plantas apodrecidas, endofítica e algumas vezes considerada endopatógena. Sua morfologia apresenta características específicas como coloração que varia do branco ao violeta. Seus macroconídios apresentam-se curtos, retos e ligeiramente finos, enquanto que os microconídios apresentam a forma oval, elíptica ou reniforme e normalmente não apresentam septo. Essa espécie é conhecida por apresentar monofilíades curtas com cabeças falsas (figura 5C e D). O micélio tem aspecto de algodão, mas algumas vezes pode apresentar aparência úmida (LESLIE e SUMMERELL, 2006).

Figura 5 - Micromorfologia e macromorfologia de *F. oxysporum* cultivado em ágar Sabouraud. (A) Macroconídio; (B) Microconídio; (C e D) filíades; (E) Macrocolônia.



Fonte: (LESLIE e SUMMERELL, 2006; AUTORES).

Dentro do gênero, *F. oxysporum* é a espécie que mais apresenta pesquisas relacionadas a aplicações industriais. Estudos envolvendo a produção de carbohidrases (celulases, endoglucanases, β -glicosidades, pectinases, poligalacturonases, xilanases) são os mais reportados (BADENES et al., 2010; MANNESSE et al., 1995; PANAGIOTOU et al., 2003; SUN et al., 1997 e 1998).

Enzimas relacionadas à patogenicidade desse fungo também são extensivamente pesquisadas, como acetil-esterases, α -L-fucosidases, α -amilases, quitinases, invertases,

lipases e proteases (HOSHINO et al., 1992; MAIA et al., 1999). Várias linhagens de *F. oxysporum* podem metabolizar compostos que também são utilizados biotecnologicamente, incluindo compostos aromáticos (BOOMINATHAN e MAHADEVAN, 1989), ftalato de butil benzilo (KIM et al., 2002), glicerol (CASTRO e LOUREIRO-DIAS, 1991), nitrilos (GOLDLUST e BOHAK, 1989), penicilina V (LOWE et al., 1986), sódio monofluoroacetato (TWIGG e SOCHA, 2001) e xilose (SINGH et al., 1992). Segundo Duhart e colaboradores (1999), *F. oxysporum* pode ser utilizado na produção de protriptilina, um antidepressivo. Quanto a produção de lipases, diversos estudos reportam o fungo *F. oxysporum* como ótimo produtor da referida enzima (Tabela 3).

Tabela 3 - Melhores condições de cultivo estabelecidas para a produção de lipases por diferentes linhagens de *F.oxysporum*.

Linhagem	Substrato indutor	pH de cultivo	Temperatura de cultivo (°C)	Atividade lipásica	Referência
<i>F. oxysporum</i>	2%(v/v) Tween 20	7,0	42	6,1 U/mg	HOSHINO et al., 1992
<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. sp. Vasinfectum</i>	glicose, glicerol, ácido mirístico, ácido oléico, trilaurina, trimiristina, óleo de oliva, SPAN 85.	5,8	45	-	RAPP, 1995
<i>F. oxysporum</i> ; <i>F. oxysporum gladioli</i> ; <i>F. oxysporum lini</i> ; <i>F. oxysporum lycopersici</i> ; <i>F. oxysporum lycopersici</i>	1% (v/v) Tween 80	9,2	37	2 U/mg; 236 U/mg; 250 U/mg; 160 U/mg; 200 U/mg; 200mg.	GARCÍA-LEPE et al., 1997
<i>F. oxysporum AM3</i>	1,5% (v/v) Triolina	9,0	35-40	-	CAMARGO-DE-MORAES et al., 2003
<i>F. oxysporum</i>	0,2 %(v/v) azeite de oliva	7,0	55	22 U/mL	SAAD et al., 2005
<i>F. oxysporum</i>	1% (v/v) azeite de oliva	8,0	50	40U/mL	PRAZERES et al., 2006
<i>F. oxysporum</i>	Água de maceração de milho e óleo de frituras	6,0	30	15 U/mL	QUADROS et al., 2009
<i>F. oxysporum</i>	1% (v/v) azeite de oliva	6,0	30	4,89 U/mg	FREGOLENTE et al., 2009
<i>F. oxysporum</i>	Azeite de oliva	9,5	28	16 U/mL	RIFAAT et al., 2010
<i>F. oxysporum</i>	Óleo de soja	7,2	30	3,38 U/mL	MALDONADO et al., 2014

Dentre seis fungos isolados de margarina por Saad e colaboradores (2005), o

fungo *F. oxysporum* demonstrou ser o melhor produtor de lipases, após oito dias de crescimento. Sua atividade foi de 22 U/mL em azeite de oliva e, após otimização, correspondeu a 35,80 U/mL em óleo de girassol (0,2-0,25 % v/v). Ao avaliar o potencial de produção de lipases por 64 microrganismos diferentes, Rifaat e colaboradores (2010) obtiveram melhores resultados pelo emprego de uma linhagem *F. oxysporum*, correspondendo a uma produção de 16 U/mL em fermentação submersa suplementada com azeite de oliva. Ainda, Maldonado e colaboradores (2014) reportaram o crescimento de *F. oxysporum* em meio líquido contendo óleo de soja como indutor de lipases. Nesse estudo, a menor atividade lipolítica foi verificada nesta espécie, correspondendo a 3,38 U/mL.

3.5 Condições que influenciam a produção de lipases microbianas: o emprego de resíduos agroindustriais

A produção de lipases microbianas é realizada de duas maneiras: fermentação em estado sólido e/ou fermentação em estado líquido. De acordo com Colin et al. (2010), a produção de lipases é influenciada tanto por condições nutricionais, quanto por fatores físico-químicos, como pH, temperatura, fornecimento de oxigênio e agitação.

A fermentação em estado sólido consiste em inocular o microrganismo em um substrato insolúvel que é utilizado como suporte ou fonte de carbono em uma concentração de água reduzida ao mínimo. Esse tipo de fermentação tornou-se atraente para aplicações específicas, uma vez que reproduz as condições naturais dos processos fermentativos (COUTO e SANROMAN, 2006).

A fermentação em estado líquido ou fermentação submersa é o processo fermentativo mais utilizado industrialmente, bem como em pesquisas de bancada. O método consiste em inocular o microrganismo em um meio líquido que contenha a fonte de carbono e nitrogênio, o pH e a temperatura adequados para a indução e produção de lipases (SHARMA et al., 2001). O conteúdo de água nesse processo é superior a 94% (ORLANDELLI e FELBER, 2012).

Assim, composição química do meio de cultura é de suma importância para a indução da síntese de lipases microbianas. O principal fator nutricional é a fonte de carbono, a qual fornecerá os nutrientes necessários para o desenvolvimento do organismo (TREICHEL et al., 2009). Essas enzimas são geralmente produzidas na

presença de óleos diversos (óleo de canola, óleo de soja, azeite de oliva, ou azeite de palma), os quais normalmente apresentam o ácido oléico como principal componente. Ainda, estas enzimas podem ser induzidas por outras substâncias tais como triacilgliceróis puros, ou até mesmo Tweens, sais biliares e glicerol (GUPTA et al. 2004; SHARMA et al., 2001). Em muitos casos, fontes de nitrogênio e micronutrientes essenciais também devem ser considerados para o crescimento. Muitas vezes, as exigências nutricionais podem ser contempladas através da suplementação do meio de cultura com compostos sintéticos, açúcares e componentes complexos, como peptona, extrato de levedura, extrato de malte, entre outros (PABLINE et al., 2014; TREICHEL et al., 2009).

Em pesquisas relacionadas à produção e otimização de lipases microbianas, o uso de resíduos agroindustriais tem aumentado significativamente (PABLINE et al., 2014). Esses resíduos contêm, na maioria das vezes, todos os componentes nutricionais necessários para o desenvolvimento dos microrganismos, bem como apresentam-se como bons indutores da síntese de lipases. Além de serem atrativos do ponto de vista nutricional, os resíduos agroindustriais tornaram-se uma alternativa de baixo custo para a produção em larga escala. Também deve-se atentar ao fato de que com a sua utilização, o risco de aumento na poluição do meio ambiente é diminuída, uma vez que estes não serão descartados de forma inadequada na natureza (SBARDELOTTO et al., 2013; SHARMA e KANWAR, 2014, TREICHEL et. al., 2010).

De acordo com Salihu et al. (2012), o resíduo agroindustrial empregado na produção de lipases deve ser criteriosamente escolhido, uma vez que a sua composição química irá determinar o sucesso ou insucesso da indução desta enzima. A concentração de ácidos graxos presentes nesse tipo de substrato deve ser investigada na literatura, ou até mesmo em estudos prévios, a fim de se obter uma produtividade das enzimas de interesse.

Dentre os resíduos utilizados na produção de lipases, destacam-se as tortas de resíduos, geradas a partir de subprodutos da extração do óleo de oleaginosas. Essas tortas apresentam um alto valor nutricional e vêm sendo utilizadas em diversas pesquisas, puras ou em combinação com outros suplementos (RAMACHANDRAN et al., 2007). Além disso, alguns óleos vegetais também são utilizados em pesquisas com lipases, uma vez que apresentam elevados teores de ácidos graxos constituídos de cadeias carbônicas longas. Segundo Ramos et al. (2011), os óleos de soja, milho, uva, oliva e girassol apresentam em sua constituição química maiores níveis de ácido oléico

e linoléico. No caso do óleo de palma, o ácido palmítico é o maior constituinte.

Outros resíduos usuais na produção de lipases microbianas são os resíduos fibrosos, subprodutos lignocelulósicos nutricionalmente classificados com base em sua digestibilidade. Dentre esses resíduos estão os bagaços de cana, laranja, abacaxi, canola, soja, e de malte, bem como as cascas de arroz, trigo, milho, abacate, maracujá, entre outros. A produção de lipases por *Candida viswanathii* foi avaliada por Almeida et al. (2013) empregando-se o farelo de trigo, casca de mandioca, o bagaço de cevada, o bagaço de cana-de-açúcar, a polpa cítrica e suas respectivas combinações como substrato. Esses autores obtiveram uma atividade em fermentação em estado sólido de 18,65 U/g quando esse microrganismo foi cultivado em farelo de trigo e bagaço de cevada na proporção 1:1. Ao utilizar farelo de trigo como substrato indutor de lipases microbianas, Roveda et al. (2010) obtiveram uma atividade correspondente a 33 U/g. Em contrapartida, a produção de lipases por *Rhizopus homothallicu* sem bagaço de cana foi investigada por Mateos Diaz et al., (2006) em cultivo submerso, correspondendo a 10,70 U/mL.

Efluentes de indústrias alimentícias, de produtos lácteos e de refinaria também têm sido utilizados como substratos na produção de lipases, uma vez que contêm altas concentrações de lipídios (>100 mg/L) (PRASAD e MANJUNATH, 2011). Ao utilizar efluentes de óleo de palma, Salihu et al. (2012) obtiveram uma produção de lipases por *Candida rugosae* equivalente a 20,26 U/mL. Outros efluentes também têm sido explorados nesse sentido, como por exemplo os efluentes de indústria de azeite de oliva (CASTRO et al., 2004); efluentes da indústria de óleo de milho (DAMASO et al., 2005); resíduos de curtume, frigoríficos, lanchonetes e até mesmo resíduos da caixa de gordura (RODRIGUES, 2011).

3.6 A casca de butiá

A família botânica Arecaceae (Palmae) é muito utilizada pelo homem, destacando-se pela intensa aplicabilidade apresentada pelas espécies desta família. Na região Sul do Brasil, o gênero *Butia* destaca-se dentro da família, apresentando espécies de valor ecológico, econômico e industrial. Esse gênero é representado principalmente pelas espécies de *Butia odorata*, *Butia capitata*, *Butia paraguayensis* e *Butia yatay*, as quais são produtoras de frutos que são consumidos *in natura*, ou que são processados e transformados em sucos, licores, mousses, bombons e sorvetes. Sua amêndoa é

comestível e pode ser transformada em óleo, o qual é utilizado em diferentes segmentos, como o alimentício, o de cosméticos (essência), dentre outros (FONSECA, 2012). Em algumas cidades do Rio Grande do Sul, as agroindústrias transformam sua polpa em sucos e tem ótima aceitação devido ao seu alto valor energético (BÜTTOW, 2008).

Dentre as espécies que mais ocorrem, a *Butia odorata* (anteriormente denominada de *Butia capitata*) e a *Butia eriospatha* são as que apresentam maior ocorrência (ROSSATO, 2007, LORENZI et al., 2010). Especificamente, a *Butia odorata* é uma palmeira medindo de 4 a 5 metros de altura. Seus frutos apresentam mesocarpo, o qual é a polpa fibrosa com sabor doce-ácido (LORENZI et al., 2006). Estas palmeiras são altamente adaptáveis em locais com clima temperado, suportando o regime anual de geadas e alta umidade (SCHWARTZ, 2008). Trata-se de uma planta monóica, em que a inflorescência é protegida por uma espata, as flores pistiladas são encontradas na região basal da ráquila até a região mediana. Cada flor é rodeada por duas flores estaminadas, sua floração ocorre de julho a fevereiro e a maturação dos frutos ocorre de novembro a maio (ROSA et al., 1998; LORENZI et al., 2004; FONSECA et al., 2007).

A composição nutricional da polpa do butiá foi avaliada por Fonseca, (2012), avaliando frutos de quatro butiazeiros distintos. Este autor constatou que 71,75 % do peso seco da polpa correspondem a carboidratos totais, 1,97% correspondem a lipídeos totais, 4,64% proteínas totais, 1,50% fibras, sendo que outros componentes representam 20,14%. A composição mineral também foi avaliada no mesmo estudo. Os macrominerais predominantes em sua constituição foram o potássio, cálcio, e magnésio. Segundo o mesmo autor, a polpa do butiá apresenta também microminerais dentre eles ferro, manganês, zinco e cobre. Destaca-se também os valores encontrados para o composto bioativo ácido L-ascórbico, sendo que a cada 100 mg de polpa, 20,52 mg correspondem ao referido ácido.

Os butiazeiros vêm sofrendo grande pressão antrópica nos últimos anos. O uso indevido dos seus frutos, a presença de gado nas áreas de ocorrência, bem como a venda ilegal de mudas proporcionou a diminuição das populações naturais dessas espécies (NAZARENO, 2013). Entretanto, o uso alternativo de produtos florestais não madeiráveis vem se tornando uma solução para a proteção de espécies nativas. Nesse sentido, a Embrapa incentiva a produção de mudas nativas em ambientes tradicionais para a conservação de recursos genéticos causando menos impactos que o uso tradicional do solo, além de proporcionar renda a pequenos produtores (EMBRAPA, 2014). Até o presente momento, o uso de nenhuma espécie de *B. odorata* ou de *B.*

capitata na produção de lipases microbianas ou de qualquer outra enzima foi reportado na literatura. Dessa forma, pesquisas que resgatem a valorização da espécie, podem propiciar o manejo sustentável dos indivíduos, gerando renda para a região de cultivo, bem como a conservação de inúmeras espécies (MAURMANN, 2010).

Dentro da família Aracaceae, destaca-se o gênero *Elaeis* pelo uso do óleo de dendê, ou óleo de palma, bem como seus efluentes para a produção de lipases. O uso de espécies deste gênero na produção de biodiesel por meio das reações de transesterificação de lipases também tem sido extensivamente investigado (FEITOSA et al., 2010; SHIN et al., 2010; YOO et al., 2011; NWUCHE e OGBONNA, 2011; TALUKDER et al., 2013).

3.7 O soro de queijo

O soro de queijo é um subproduto de relativa importância na indústria leiteira, tendo em vista o volume produzido e sua composição nutricional (BALDASSO et al., 2011). Estima-se que a produção mundial do soro de queijo seja aproximadamente 180 milhões de toneladas/ano (SPALATELU, 2010).

O soro de queijo pode ser utilizado na alimentação animal ou pode ser processado em pó, para a produção de biscoitos e de alimentos lácteos. Porém, devido ao seu elevado teor de umidade, a desidratação pode se tornar economicamente inviável nesses processos. Apesar das possibilidades de aplicação do soro de queijo, sua utilização demanda custos e, por esta razão, expressivas quantidades deste resíduo (cerca de 50%) são frequentemente incorporadas em águas residuárias (SPALATELU, 2010). Desta forma, a deposição do soro de queijo no meio ambiente representa um sério problema, tanto econômico, quanto ambiental (MOLLEA et al., 2013).

Contrariamente, o uso do soro de queijo nos meios de fermentação pode ser não apenas vantajoso para o meio ambiente, como também contribuir para uma economia sustentável (PANESAR et al., 2007). O soro de queijo é rico em açúcares e outros nutrientes, os quais podem ser usados como excelentes substratos para o cultivo de muitos microrganismos. Atualmente, o emprego do resíduo de queijo em diversos bioprocessos e tem sido considerado bastante interessante e promissor, especialmente na obtenção de bioplásticos, peptídeos bacterianos (bacteriocinas), enzimas e exopolissacarídeos (MOLLEA et al., 2013). Por exemplo, Nath et al. (2008) verificaram um aumento na produção de polihidroxibutirato por *Methylobacterium* sp. ao suplementar o meio de cultivo com o soro de queijo. Silva et al. (2009) investigaram o

uso deste resíduo como fonte de carbono para a produção de goma xantana por duas linhagens de *Xanthomonas campestris*. O soro de queijo também tem sido extensivamente utilizado nos processos fermentativos para a obtenção de ácido láctico por diferentes espécies de *Lactobacillus*, *Lactotoccus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* (MOLLEA et al., 2013). Uma recente revisão reporta a produção em batelada de nisina, uma bacteriocina, por uma linhagem de *Lactobacillus lactis*, usando o soro de queijo como um meio de cultivo pouco dispendioso (ARAUZ et al., 2009).

Este resíduo também tem sido explorado nos processos de produção de enzimas microbianas. A produção de β -galactosidases e de proteases usando o resíduo de queijo como substrato foi reportada nos estudos de Vasiljevic e Jelen (2001). Em relação a produção de lipases, o soro de queijo foi previamente utilizado como substrato apenas nos estudos conduzidos por Tommaso e colaboradores (2011). Quando este resíduo foi empregado como fonte única de carbono no meio de cultura, os níveis de lipases atingidos foram de 5,18 U/mL. No entanto, após a suplementação do meio com Tween 80 e azeite de oliva e posterior otimização pelo emprego de ferramentas estatísticas, os níveis alcançados corresponderam a 15,0 U/mL.

3.8 O emprego da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) como ferramenta para a otimização de lipases fúngicas

Tradicionalmente, a produção e a otimização da produção de enzimas fúngicas é realizada pelo monitoramento dos fatores que influenciam essa produção individualmente (SHARMA e KANWAR, 2014). Enquanto se avalia um fator separadamente, o outro mantém-se constante e não há a averiguação da interação desses para a resposta esperada, o que torna essa maneira de experimentação desvantajosa. Outro ponto desfavorável é o número de experimentos necessários para a realização da pesquisa, o que eleva os custos da pesquisa e também o tempo necessário para sua concretização (BEZERRA et al., 2008).

A fim de resolver esse problema, diversos modelos matemáticos são propostos, envolvendo uma análise de fatores multivariados. Dentre estes, uma das técnicas mais utilizadas nos últimos cinco anos de pesquisas na produção de enzimas é a metodologia de superfície de resposta (MSR) (AMIN et al., 2011).

A MSR é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas que, quando

originalmente desenvolvida por Box e Wilson em 1951, visava determinar respostas mais aproximadas do ótimo em ensaios químicos. Porém, os próprios autores destacavam que essa metodologia poderia ser utilizada em outras áreas da Ciência. Trata-se de técnicas estatísticas que se ajustam ao modelo empírico de dados experimentais, utilizando funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, modelar as condições experimentais até a sua otimização (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

O uso da MSR apresenta alguns objetivos, incluindo o estabelecimento da relação entre a resposta e os fatores analisados, podendo prever esse resultado; detecção da importância dos fatores; e a determinação das condições ideais para que os fatores resultem no máximo ou no mínimo da resposta esperada (KHURI e MUKHOPADHYAY, 2010).

De acordo com Bezerra et al., (2008), algumas etapas devem ser seguidas para a utilização da MSR: (1) seleção das variáveis; (2) escolha do delineamento e realização dos experimentos conforme a matriz experimental selecionada; (3) tratamento dos dados obtidos através da função polinomial; (4) avaliação de adequação do modelo; (5) possibilidade de direcionamento ao ideal; (6) obtenção dos valores ótimos para cada variável estudada.

Assim, pode-se dizer que a fundamentação da MSR está baseada na relação entre uma resposta de interesse (y) que é a variável dependente, e os fatores associados, os quais são as variáveis independentes (x_1, x_2, \dots, x_n), sendo que ambas são aproximadas pelo modelo polinomial (equação 1) (KHURI e MUKHOPADHYAY, 2010):

$$y=f(x)\beta+\varepsilon \quad (1)$$

y = resposta esperada

$f(x)$ =função vetorial das variáveis independentes

β = um vetor de p coeficientes de constantes desconhecidas referido para os parâmetros

ε = erro experimental aleatório

O modelo mais simples de MSR baseia-se numa função linear (2) onde k é o número de variáveis, θ é o termo constante, i são os parâmetros lineares; x^i representa as variáveis e ε é o residual associado ao experimento (equação 2):

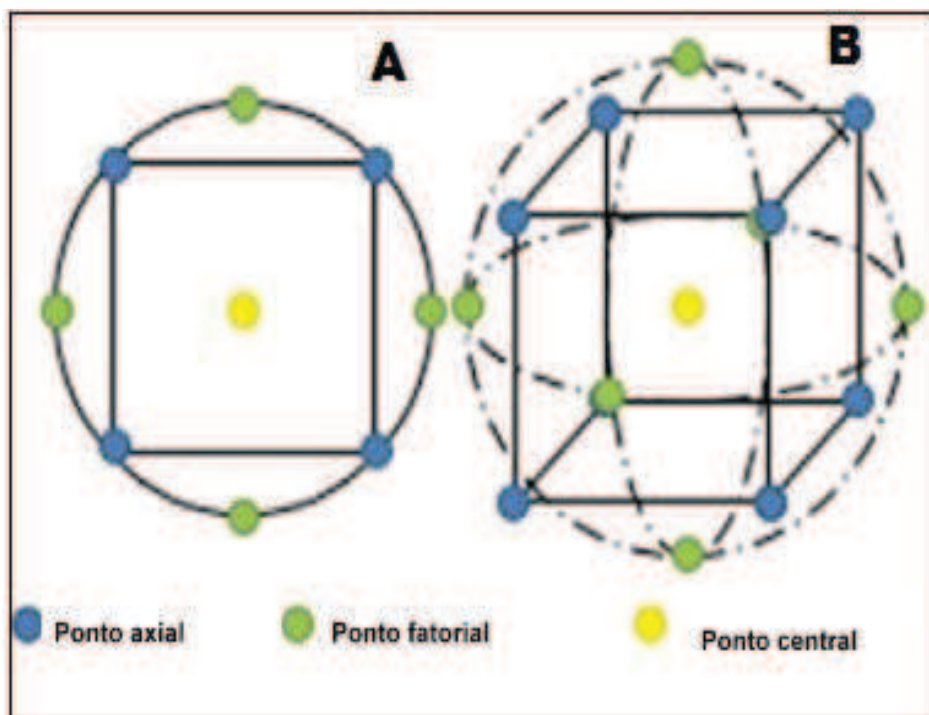
$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (2)$$

Para avaliar respostas que contenham curvatura é usado o modelo de segunda ordem, o qual contém todos os componentes lineares, associados aos componentes quadráticos nos seguintes termos:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (3)$$

Dentre o modelo de segunda ordem, o delineamento mais conhecido é o Delineamento Central Composto (DCC). Esse delineamento foi proposto por Box e Wilson, (1951) e é composto por três partes: fatorial, axial(α) e central. Abaixo está exemplificado um DCC com duas variáveis (Figura 6A) e três variáveis (Figura 6B). No total, para um DCC com k fatores a equação k^2+2k+1 é o resultado entre os níveis dos fatores estudados.

Figura 6 - Visualização gráfica de um planejamento composto central para (A) q = 2 fatores; (B)q=3 fatores



Fonte: WITEK-KROWIAK et al., 2014.

Assim, para dois fatores com níveis codificados sem repetição no ponto central, nove tratamentos são gerados ($2^3+2 \times 2+1$), conforme apresentado na Tabela 4. No caso de três fatores, 18 tratamentos seriam gerados.

Tabela 4 - Combinações entre os níveis A e B.

	Fator A	Fator B	Tratamento
Pontos cúbicos	-1	-1	1
	1	-1	2
	-1	1	3
	1	1	4
Pontos axiais	$-\alpha$	0	5
	α	0	6
	0	$-\alpha$	7
	0	α	8
Ponto central	0	0	9

Fonte: MENDONÇA, 2012

Atualmente, muitos estudos vêm utilizando a MSR aplicável ao Delineamento Central Composto (DCC) devido algumas vantagens que esse modelo apresenta. Seu uso é estimulado pela necessidade de novas formas de processos industriais, sendo o uso de modelos estatísticos ferramentas fundamentais nesse sentido (MONTGOMERY, 1999; BAS et. al., 2007).

Nos estudos de otimização de lipases, o uso da estatística MSR é muito comum (SHARMA; KANWAR, 2014). Pesquisas relacionadas à produção enzimática utilizam esta técnica, a fim de elevar os níveis de enzimas produzidos (ALMEIDA, 2012).

Em seus estudos, Wolski et al. (2008) relataram o uso da MSR na otimização de lipases por *Penicillium* sp. em fermentação submersa. Nas condições experimentais otimizadas, os autores obtiveram uma atividade correspondente a 21 U/mL. Papagora e colaboradores (2013) também empregaram a MSR a fim de otimização a produção de lipases pela levedura *Debaryomyces hansenii*. Nesse estudo, os autores verificaram o efeito das variáveis concentração de glicose, de azeite de oliva e pH de cultivo sobre a produção de lipases, empregando o DCCR, o qual resultou em 20 tratamentos experimentais. Os níveis de atividade alcançados foram de 10,12 U/mL. Utilizando essa mesma ferramenta estatística, a atividade lipolítica de um fungo do gênero *Fusarium* foi analisada por Oliveira et al. (2014), resultando em um aumento da atividade correspondente a 87,27%.

4. Material e Métodos

Os materiais e métodos específicos utilizados estão descritos no capítulo correspondente aos artigos científicos.

5. Resultados

Os resultados estão descritos nos capítulos correspondentes aos artigos científicos das seções a seguir.

Capítulo I

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS LIPOLÍTICOS: USO DO SORO DE QUEIJO COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO

Resumo

Microrganismos são amplamente utilizados na Biotecnologia em virtude de várias vantagens que apresentam. Nos últimos anos, a produção de enzimas industrialmente importantes tem estimulado sua exploração. Dentre as enzimas de maior interesse, podem ser citadas as lipases, capazes de promover a quebra de moléculas de lipídeos de cadeia carbônica constituída de mais de dez átomos de carbono, liberando glicerol e ácidos graxos livres. O presente trabalho teve como objetivo isolar e selecionar linhagens fúngicas produtoras de lipases. Ainda, objetivou-se otimizar a produção de lipases pela melhor linhagem previamente selecionada, utilizando o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) aplicável a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Em relação aos fungos filamentosos, 24 linhagens foram isoladas, pertencentes a 11 gêneros distintos. Dentre estas, a linhagem BV inicialmente isolada de óleo contaminado e posteriormente identificada como *Fusarium oxysporum* destacou-se pelos níveis de lipases produzidos (12,16 U/mL). Dentre as leveduras isoladas, a linhagem L1 apresentou os maiores níveis de produção, correspondendo a 45,92 U/mL. Quando diversas fontes de carbono foram avaliadas como indutoras da produção de lipases pela levedura L1, bons níveis de produção foram obtidos em presença do soro do queijo (26,70 U/mL). Após a otimização empregando-se as ferramentas estatísticas, uma produção 10 vezes superior a inicial observada foi obtida (267,07 U/mL). As melhores condições estabelecidas para a produção de lipases pela levedura L1 foram 1,1 % de soro de queijo, pH de cultivo de 4,0 e tempo de cultivo de 24 horas. Por meio deste estudo, evidencia-se o potencial do soro de queijo como um substrato atrativo e de baixo custo para a produção de lipases microbianas.

Palavras-chave: Bioprospecção, lipases, resíduos agroindustriais, metodologia de superfície de resposta.

Abstract

Microorganisms are widely used in Biotechnology, due to several advantages that they present. In recent years, the production of industrially relevant enzymes has been stimulated their exploration. Within the most interesting enzymes, it can be cited the lipases, which catalyze the hydrolysis of lipids, with the consequent release of organic acids and glycerol. The present studies aimed to isolating and selecting lipase producers fungal strains. In addition, this work aimed optimize the lipases production by the best strain previously selected, using the Central Composite Rotatable Design (CCRD) applicable to Response Surface Methodology (RSM). In relation to filamentous fungi, 24 strains were isolated, belonging to 11 distinct genera. Among these, the BV strain initially isolated by contaminated oil and subsequently identified as *Fusarium oxysporum* showed the highest lipase levels (12.16 U/mL). Among the isolated yeasts, the L1 strain exhibited the highest levels of production, corresponding to 45.92 U/mL. When distinct carbon sources were evaluated as lipase production inducers by L1 yeast, good production levels were obtained in the presence of cheese whey (26.70 U/mL). After optimization employing statistical tools, a production 10 times higher than the initial production was obtained. The best conditions established for lipase production by L1 yeast were 1.1% of cheese whey, pH of medium 4.0 and cultivation time of 24 hours. This study therefore presents the potential of cheese whey as an attractive and inexpensive substrate for the production of microbial lipases.

Key-words: Bioprospection, lipolytic enzymes, agroindustrial residues, response surface methodology.

Introdução

Nos últimos anos, a diversidade microbiana vem sendo explorada, em virtude da heterogeneidade de ambientes naturais e do enorme potencial que os microrganismos apresentam, proporcionando a obtenção de novos produtos biotecnológicos (VIBHA e NEELAM, 2012). O Brasil é um dos países que apresenta a maior diversidade de organismos vivos de uma forma em geral. No entanto, o conhecimento sobre a riqueza de suas espécies microbianas ainda é escasso (COUTO et al., 2014).

A produção de enzimas por microrganismos tem sido um dos principais focos mundiais em pesquisas biotecnológicas nos últimos anos. Quando empregados para este fim, os microrganismos se destacam pela facilidade, versatilidade, heterogeneidade e especificidade com que suas enzimas atuam sobre o substrato (SHARMA et al., 2014; HASAN et al., 2010; ABADA, 2008). De acordo com Rodrigues (2011), a triagem de fungos produtores de enzimas é de suma importância para o descobrimento de novas linhagens e novos catalizadores biológicos, sendo o conhecimento sobre a diversidade de microrganismos capazes de sintetizá-las um ponto crucial para essas novas descobertas.

Estudos com isolamentos de fungos são realizados no mundo inteiro, sendo os locais de seu isolamento bastante variados. Normalmente, parte-se da hipótese que alguns lugares são preferenciais para encontrar uma maior riqueza de microrganismos produtores de lipases. Locais que contenham ácidos graxos, como por exemplo efluentes de indústrias alimentícias, abatedouros, locais de produção de alimentos ou até mesmo objetos comuns também podem ser utilizados nesse sentido, além do solo, o qual constitui um dos locais mais utilizados para o isolamento de fungos (SHARMA et al., 2001; ABD RAHMAN et al., 2007).

As enzimas lipolíticas compreendem um grupo de hidrolases denominadas lipases (E.C. 3.1.1.3) e esterases (E.C.3.1.1.1). As lipases são serino-hidrolases, formadas por resíduos de serina, histidina e aspartato/glutamato pertencentes ao grupo estrutural das $\alpha\beta$ -hidrolases. Promovem a catálise das ligações de ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, ou seja, constituídos por mais de dez átomos de carbono, transformando-os em diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres (GONÇALVES et al., 2007). Contrariamente, as esterases são capazes de hidrolisar acilgliceróis que contenham menos de dez carbonos em sua constituição (MESSIAS et al., 2011).

Além da hidrólise de triacilgliceróis, as lipases apresentam outras funções consideradas essenciais, tanto fisiologicamente, quanto industrialmente. Essas funções ocorrem em condições limitantes de água no meio reacional, onde revertem a hidrólise em esterificação ou transesterificação (interesterificação, alcoólise, acidólise); aminólise (síntese de aminas) e lactonização. Estas são características desejáveis para a aplicação em indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosmética e de química fina (PAQUES e MACEDO, 2006).

Dentre os estudos envolvendo fungos produtores de lipases, a maior parte reporta a produção por fungos filamentosos (TREICHEL et al., 2010). Entretanto, as leveduras também têm se mostrado promissoras nesse sentido. A respeito destas últimas, destacam-se linhagens pertencentes aos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Torulopsis* e *Yarrowia* (RODRIGUES, 2011). Porém, novas linhagens produtoras de lipases que não haviam sido reportadas anteriormente na literatura foram recentemente descritas, tais como as leveduras *Pichia lynferdii* (KIM et al., 2010), *Pseudozyma hubeiensis* (BUSSAMARA et al., 2010) e *Candida viswanathii* (ALMEIDA et al., 2013).

A utilização de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de lipases vem sendo cada vez mais explorada ao longo dos anos, visto que sua utilização pode contribuir para a redução dos custos de produção destas enzimas (SALIHU et al., 2012). O soro de queijo é um subproduto de indústrias lácteas, o qual é obtido após a precipitação da caseína na produção de queijo (BALDASSO, 2008). Em geral, este resíduo é constituído por 93% de água e 7% de matéria seca, da qual 71% é lactose, 10% de proteína bruta, 12% de gorduras e 11% de sais minerais (LIZIEIRE e CAMPOS, 2006). Assim, do ponto de vista fermentativo, o soro de queijo é altamente atrativo, pois, além de sua rica composição favorecer os processos fermentativos, o descarte desse resíduo pode causar sérios danos ambientais (LEITE et al., 2012). Estima-se que a produção mundial estimada do soro de queijo seja aproximadamente 180 milhões de toneladas/ano (SPALATELU, 2010). No Brasil, a geração do soro de queijo é bastante considerável, com estimativas de geração próximas a 6,03 milhões de toneladas por ano (MORAIS et al., 2013).

O presente trabalho teve como objetivo isolar e selecionar fungos produtores de lipases, a partir de ambientes distintos. Adicionalmente, a otimização da produção dessas enzimas pela melhor linhagem lipolítica foi conduzida, empregando-se o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) aplicável à Metodologia de

Superfície de Resposta (MSR) utilizando o resíduo de queijo como substrato alternativo.

Material e métodos

Isolamento de fungos a partir de diferentes amostras

As linhagens fúngicas descritas no presente estudo foram inicialmente isoladas a partir de águas residuais provenientes de dois frigoríficos (frigorífico 1 e frigorífico 2), de sabão, de óleo contaminado e de ovas de peixe. Para o isolamento dos fungos, as amostras foram submetidas à técnica de diluição sucessiva. Para tal, 1 mL de amostra foi suspenso em 9 ml de água destilada estéril (diluição 1:10). Desta diluição, 10 ml foram adicionados a 90 ml de água destilada estéril (diluição 1:100), da qual 1 ml foi semeado em Ágar Saboraud adicionado de cloranfenicol (100 mg L^{-1}), contido em placas de Petri, em três réplicas. As placas foram incubadas a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e o crescimento fúngico foi acompanhado por sete a dez dias em relação aos fungos filamentosos e por 3 a 5 dias, em relação aos fungos leveduriformes. Constatado o crescimento de colônias fúngicas, estas foram diferenciadas por suas características morfológicas de cor, forma e textura. A partir de cada tipo morfológico uma colônia foi selecionada, a qual foi transferida para uma nova placa de ágar Saboraud. Detectadas as colônias puras por observação microscópica, as mesmas foram mantidas em meio sólido de Vogel (VOGEL, 1964) e também em ágar Saboraud. Os repiques foram realizados periodicamente, sendo mantidos a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, durante sete e três dias em relação aos fungos filamentosos e leveduriformes, respectivamente. Posteriormente, as culturas foram armazenadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. As culturas de fungos filamentosos foram preservadas em óleo mineral a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, enquanto que as leveduriformes foram preservadas por meio de seu congelamento a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, em presença de glicerol a 15%.

Identificação dos fungos filamentosos pelo uso de marcadores morfológicos

Os fungos filamentosos isolados foram inicialmente agrupados em morfoespécies segundo as características macroscópicas das colônias. Posteriormente, a micromorfologia das estruturas reprodutivas foi acessada por meio do emprego da técnica de microcultivo, sendo realizadas preparações a fresco utilizando a água como

líquido de montagem. As preparações foram observadas em microscópio ótico. As estruturas apresentadas foram comparadas com aquelas disponíveis em chaves taxonômicas (LACAZ et al., 1998; ST- GERMAIN e RICHARD SUMMERBELL, 1996) na tentativa de identificar os isolados.

Determinação da atividade lipásica e de proteínas

A atividade lipásica foi determinada segundo o método proposto por YANG et al.(2002), por meio da incubação do filtrado de cultura em meio tamponado contendo o substrato *p*-nitrofenil palmitato 0,5mM. Este foi inicialmente solubilizado em DMSO e posteriormente diluído 20 vezes em tampão fosfato 50mM pH 7,0 na presença de triton X-100 a 0,5%. Em intervalos de tempos pré-estabelecidos, a reação foi interrompida pela adição de tetraborato de sódio e a leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro a 405 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os valores obtidos foram comparados seguindo curva padrão de *p*-nitrofenol.

Além da quantificação desta atividade, a determinação do teor de proteínas intra e extracelulares foi determinada de acordo com o método colorimétrico de Bradford modificado, utilizando a soro albumina bovina como padrão (SEDMAK e GROSSBERG, 1977).

Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases

As linhagens empregadas neste estudo previamente isoladas foram avaliadas quanto ao seu potencial de produção de lipases. Para a produção de esporos, estas foram cultivadas em meio sólido de Vogel (1956), contendo 1,5 % de glicose e 1,5% ágar, a 28 °C, durante sete dias. Após este período, os conídios foram suspensos em água destilada esterilizada, sendo a suspensão filtrada em lã de vidro estéril para a remoção dos fragmentos de hifas e suas concentrações ajustadas em câmara de Neubauer para $1,0 \times 10^7$ esporos ml^{-1} . Um mililitro desta suspensão foi inoculado em frascos Erlenmeyersde 125 ml, contendo 25 ml de meio líquido de vogel, pH6,5, suplementados com azeite de oliva a 1%. Após o crescimento em meio líquido por cinco dias, as culturas foram filtradas a vácuo em funil de Büchner. Desta forma, os filtrados do meio de cultivo livre de células e o micélio foram obtidos, os quais foram utilizados como fonte de enzimas e de proteínas intracelulares, respectivamente.

Seleção de leveduras produtoras de lipases

A seleção das leveduras lipolíticas foi realizada em duas etapas. Primeiramente, o teste indutivo em placas de Petri foi realizado, segundo a metodologia proposta por Hankin e Anagnostakis (1977). Este teste foi realizado a fim de determinar semi-quantitativamente a produção de lipases. Para tal, o meio sólido foi composto por (g/L): peptona, 10; NaCl, 5; CaCl₂.2H₂O, 0.1, ágar, 20, suplementado com 1% (w/v) de Tween 20, Tween 80 e azeite de oliva, respectivamente. O pH foi ajustado para 5,6 e o meio autoclavado a 121 °C, por 15 min. As culturas foram incubadas a 28 °C, por um período de tempo suficiente para que as colônias fúngicas fossem evidenciadas. Assim, foi possível determinar o tamanho do halo de crescimento das colônias e do halo de degradação, permitindo o cálculo do índice enzimático, dado pela razão entre o diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia. Em seguida, as linhagens que apresentaram maiores índices enzimáticos foram inoculadas em meio líquido. A fermentação submersa foi conduzida em frascos Erlenmeyers contendo 25 mL de meio líquido de Vogel, pH 6,5, suplementados com 10% de azeite de oliva. Os frascos foram mantidos em estufa a 28 °C, por cinco dias. Após este período, as culturas foram centrifugadas a 5000 g, a 4°C, por 10 minutos. Desta forma, o filtrado de meio de cultivo foi obtido, o qual foi utilizado como uma preparação de proteínas e enzimas extracelulares.

Seleção da melhor fonte indutora de lipases para a levedura L1

A fim de estabelecer a melhor fonte indutora da produção de lipases, a linhagem previamente selecionada foi cultivada em meio líquido de Vogel, suplementado com fontes de substratos lipídicos, (óleo de andiroba, óleo de copaíba, óleo de pequi, óleo de buriti, óleo de mamona, azeite de oliva, sãobão em barra, borra de café, casca de butiá em farelo, casca de abacate em farelo) incluindo resíduos *in natura* e resíduos agroindustriais. Os cultivos foram realizados a 28 °C, por cinco dias, sob condição estacionária, em frascos de Erlenmeyers contendo 25 mL de meio líquido de Vogel, pH 7,0, suplementados com 1% (m/v) das diferentes fontes de carbono.

Otimização da Produção de lipases utilizando DCCR e MSR empregando-se o soro de queijo como substrato.

Com o intuito de elevar os níveis de lipases produzidas pela linhagem L1, as condições de cultivo foram avaliadas por meio do emprego do DCCR e as respostas relacionadas à atividade lipásica observada foram analisadas pela MSR. Os experimentos foram realizados por 2³ fatorial: concentração do soro de queijo [S], pH do meio de cultivo [pH] e tempo de incubação (T), com cinco níveis, gerando 17 combinações de tratamentos com três amostras no ponto central e seis pontos axiais.

Os dados apresentados foram ajustados de acordo com a seguinte equação polinomial de primeira ordem (1):

$$Y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad (1)$$

Onde Y é a resposta prevista; β_0 representa a interseção; β_1 , β_2 e β_3 são os coeficientes lineares, β_{11} , β_{22} e β_{33} são os coeficientes quadráticos; β_{12} , β_{13} e β_{23} são os coeficientes de interação e x_1 , x_2 e x_3 , são as variáveis independentes, concentração do resíduo [S], tempo de incubação (T) e pH, respectivamente. O termo ε representa o erro experimental.

A combinação das diferentes variáveis que resultou na resposta máxima em relação à produção de lipases foi validada experimentalmente, por meio do cultivo da levedura L1 sob estas condições otimizadas, em triplicata. A análise de variância (ANOVA) e as superfícies de resposta para os experimentos de otimização foram gerados pelo programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, USA).

Resultados e Discussão

Os fungos apresentam a maior riqueza de espécies em relação a maioria dos organismos e, por esta razão, apresentam grande interesse ecológico e econômico (VARGA et al., 2011; BLACKWELL et al., 2011). Fungos capazes de sintetizar lipases, particularmente, são encontrados em diversos habitats, incluindo os solos contaminados com resíduos de óleos vegetais, subprodutos de laticínios e frigoríficos, sementes e comida deteriorada, entre outros (SHARMA et al., 2001).

Segundo OGAWA et al.(1999), o isolamento e a seleção são os meios mais eficientes para a detecção de novas enzimas, o que é consequência da diversidade de

microrganismos existentes e da versatilidade das enzimas produzidas. A linhagem é o fator determinante no processo fermentativo, sendo que esta deve apresentar características que a tornem atrativa, como ser de fácil cultivo e manutenção, ter um bom rendimento na produção e preferencialmente não ser patogênica (COLEN, 2006).

No presente trabalho, 54 linhagens fúngicas foram isoladas de diferentes ambientes e avaliadas em relação a sua capacidade de produção de lipases. Como pode ser observado na Tabela 1, as leveduras representam o maior número de linhagens isoladas, correspondendo a 56,37% dos isolados, enquanto que os fungos filamentosos representam 43,63% das respectivas linhagens.

Os fungos filamentosos foram identificados ao nível de gênero por meio da observação de suas características morfológicas micro e macroscópicas (Tabela 2). Verifica-se que as linhagens isoladas pertencem a 11 gêneros fúngicos, ocorrendo um maior número de representantes pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. No caso do isolado N6, a identificação baseada apenas na observação de seus caracteres morfológicos não foi possível.

Similarmente ao presente estudo, diversas linhagens de fungos filamentosos tem sido isoladas a partir de ambientes ricos em lipídeos. Nos estudos de Tomiya et al., (2008), 19 fungos filamentosos pertencentes a sete gêneros diferentes foram isolados da torta de mamona, enquanto que apenas seis espécies pertencentes a três gêneros foram isoladas a partir de sua casca. Neste estudo, as espécies mais prevalentes pertenciam aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Ciafardini et al. (2006), ao estudarem o azeite de oliva recém produzido, notaram que o mesmo apresentava uma rica microbiota. Dentre os microrganismos detectados estavam várias leveduras identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida wickerhamii*, *Williopsis californicae* *Candida boidinii*, sendo que *S. cerevisiae* e *W. californica* mostram-se boas produtoras de lipases.

Fungos filamentosos selecionados como produtores de lipases

A bioprospecção de fungos filamentosos é mais comum na Biotecnologia de enzimas, uma vez que esses organismos apresentam relativa simplicidade de manutenção e exploração de seus recursos em pesquisas de bancadas.

Dentre os 24 fungos filamentosos isolados, a linhagem BV isolada de óleo contaminado e posteriormente identificada como *Fusarium oxysporum* apresentou os

maiores níveis de produção de lipases (12,16 U/mL), seguida pela linhagem M10 isolada de águas residuais de frigorífico (3,3 U/mL) (Fig. 1A). Estes fungos também apresentaram os maiores níveis de atividade específica, correspondendo a 900 U/mg proteína e 1000 U/mg proteína, respectivamente. Bons níveis de produção em unidades por volume também foram produzidos pelas linhagens N4 e AS3. Por meio da avaliação do crescimento fúngico relevado pelo teor de proteínas intracelulares (Fig. 2), nota-se que a linhagem AS2 apresentou o melhor crescimento no azeite de oliva, mas não foi capaz de produzir níveis significativos de lipases. Verifica-se que, para a grande maioria dos fungos, a produção de lipases não esteve correlacionada com o seu crescimento.

Em relação ao gênero *Fusarium*, a espécie *F. oxysporum* é a que mais apresenta pesquisas relacionadas e aplicações industriais. Quanto à produção de lipases, diversos estudos reportam este microrganismo como excelente produtor da referida enzima nos últimos dez anos (HOSHINO et al., 1992; RAPP et al., 1995; GARCÍA-LEPE et al., 1997; CAMARGO-DE-MORAES et al., 2003; PRAZERES et al., 2006; QUADROS et al., 2009; FREGOLENTE et al., 2009).

Dentre seis fungos isolados de margarina por Saad e colaboradores (2005), o fungo *F. oxysporum* demonstrou ser o melhor produtor de lipases após oito dias de crescimento. A produção enzimática obtida correspondeu a 22 U/mL em azeite de oliva e, quando otimizada, correspondeu a 35,80 U/mL em óleo de girassol. Ao avaliar o potencial de produção de lipases por 64 microrganismos diferentes, Rifaat e colaboradores (2010) também obtiveram melhores resultados pela linhagem *F. oxysporum*, cultivado em fermentação submersa em presença de azeite de oliva. (16 U/mL). Entretanto, ao cultivar uma linhagem *F. oxysporum* em meio líquido contendo óleo de soja, a produção de lipases obtida por Maldonado e colaboradores (2014) foi inferior aos demais fungos analisados, correspondendo apenas a 3,38 U/mL.

Detecção de leveduras produtoras de lipases

Os resultados referentes a pré-seleção em placa contendo tres fontes indutoras para a visualização do halo de crescimento, foi realizada com o intuito de avaliar o potencial de produção de lipases para as leveduras isoladas estão apresentados na Tabela 3. Nota-se que apenas a linhagem N3 não foi capaz de produzir lipases. Em contrapartida, as demais linhagens leveduriformes apresentaram um bom índice

enzimático. Quando o azeite de oliva foi utilizado como substrato, a linhagem L1 isolada de óleo contaminado foi a que apresentou o maior índice enzimático, correspondendo a 3,51. Bons índices enzimáticos também foram apresentados por esta linhagem em presença de Tween 20 e Tween 80 como pode ser observado na tabela 3. A partir desta avaliação semi-quantitativa, foi possível selecionar as linhagens mais promissoras em relação a produção de lipases. Assim, nove leveduras, as quais apresentaram índices enzimáticos significativos em relação aos três substratos empregados foram selecionadas, a fim de serem posteriormente avaliadas em cultivo submerso.

No presente estudo, as melhores linhagens lipolíticas foram isoladas a partir de óleo contaminado. Ambientes considerados inóspitos também foram avaliados por outros autores, em relação a sua capacidade de permitir o crescimento microbiano. Rodríguez-Rodríguez e colaboradores (2012) isolaram 149 bactérias de tanques de armazenamento de combustíveis na Costa Rica, avaliando também a capacidade de produção de surfactantes. Das bactérias isoladas, 16,8 % tiveram um crescimento evidenciado em óleo diesel, bem como dentro dos isolados, 14% produziram surfactantes. Em estudos de biodegradação, Ogbo e colaboradores (2010) notaram que o fungo actinomiceto *Pleurotus tuber-regium* foi bastante eficiente na degradação de óleo diesel presente em solo, apresentando assimilação de hidrocarbonetos correspondente a 55%. O crescimento microbiano em derivados do petróleo (óleo diesel, gasolina, etc.) são fortemente influenciados pela presença da água, mesmo em condições mínimas (1% v/v). Os demais fatores nutricionais essenciais para o crescimento microbiano, como oxigênio, temperatura do combustível, presença de fósforo e enxofre são supridos pela capacidade de hidrolisar e assimilar os hidrocarbonetos constituintes desses derivados (KLOFUTAR e GOLOB, 2007; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012).

Cinquenta e nove linhagens de fungos produtores de lipases foram isolados do solo do cerrado brasileiro por Colen et al. (2006). Dentre estes, 21 estirpes foram selecionadas por apresentarem um halo enzimático superior a 1,2. A melhor linhagem lipolítica, identificada como *Colletotrichum gloesporioides*, foi capaz de produzir 27,7 U/mL sob condições otimizadas.

De um total de 14 linhagens que foram isoladas da polpa de pequi, solo enriquecido com abacate e que pertenciam a uma coleção de culturas por Gonçalves et al. (2007), a linhagem *Yarrowia lipolytica* foi a mais promissora em relação a produção de lipases, a qual foi posteriormente submetida ao cultivo em estado líquido.

No presente estudo, as nove linhagens leveduriformes pré-selecionadas anteriormente foram cultivadas sob fermentação submersa em meio de Vogel suplementado com 1% de azeite de oliva. Como demonstra a Tabela 4, os maiores níveis de atividade lipase foram produzidos pela linhagem L1, correspondendo a 45,92 U/mL e 168,20 U/mg proteína. Ainda, pode-se destacar o potencial de produção do isolado L3, correspondendo a 3,63 U/mL. Apesar de terem apresentado um bom índice enzimático em presença de azeite de oliva, as demais linhagens leveduriformes não apresentaram bons níveis de produção de lipases quando cultivadas nesse substrato. Ao avaliar a constituição dos meios de cultura empregados em cada etapa, verifica-se diferenças importantes na constituição dos mesmos, como a presença de peptona nos testes de atividade em placa. Assim, sugere-se que a peptona seja um componente indispensável, a fim de promover o crescimento fúngico, bem como a síntese e a liberação de lipases por essas linhagens. De acordo com Sharma et al. (2001), os microrganismos normalmente produzem altos níveis de lipases quando fontes de nitrogênio orgânicas são usadas. Nesse sentido, extrato de levedura, peptona e farelo de soja têm sido tradicionalmente empregados na produção de lipases fúngicas (TREICHEL et al., 2010). Entretanto, a suplementação do meio de cultura com esses nutrientes podem inviabilizar o processo de produção destas enzimas.

A partir do isolamento de 206 leveduras do óleo de palma coletadas em fábricas do sul da Tailândia, Srimhan et al. (2011) constataram através de método semi-quantitativo utilizando a rodamina-B, que apenas 49 linhagens de leveduras apresentaram boa atividade lipolítica. Dentre 90 isolados de fungos bioprospectados por Almeida (2012), uma linhagem de *Candida viswanathi* destacou-se pelos elevados níveis de lipases produzidos. Após o processo de otimização, uma produção equivalente a 1204 U/h foi obtida.

Mafakher et al., (2010) isolaram leveduras produtoras de lipases e ácido cítrico de águas residuais de estações de tratamento de agroindústrias da cidade Isfahan, no Iran. Dentre 300 leveduras isoladas, seis linhagens(M1-M6) apresentaram atividade lipolítica em presença de tributirina e Rodamina B. As linhagens M1 e M2 posteriormente identificadas como *Y. lipolytica* foram então testadas em diferentes fontes de carbono, destacando-se a M1 como melhor produtora, e o azeite de oliva o melhor indutor estabelecido, obtendo-se uma produção correspondente a 12 U/mL.

Kumar e Gupta (2008) isolaram 15 leveduras de petróleo e em áreas de lodo com contaminação de óleo em Delphi (Índia). Os isolados foram purificados e

verificados quanto ao seu potencial lipolítico. Dentre as linhagens de leveduras, uma delas foi selecionada para estudos posteriores, com base no maior halo de lipólise. Com 99% de homologia em sua sequência de DNA, esta linhagem foi identificada como *Trichosporon* sp. Em um estudo com uma pré-seleção de 16 leveduras, Kim et. al. (2010) selecionaram uma levedura não reportada na literatura anteriormente como ótima produtora de lipases, a *Pichia lynferdii* Y-7723.

Seleção da melhor fonte de carbono indutora de lipases pela levedura L1

Com o intuito de induzir a produção de lipases pelo isolado L1, diferentes fontes de carbono ricas em ácidos graxos foram testadas (Fig. 3A). Nota-se que, dentre as fontes avaliadas, o azeite de oliva foi capaz de induzir os maiores níveis de produção de lipases, correspondendo a 45,92 U/mL. Estes elevados níveis de produção observados em presença do azeite de oliva podem ser justificados por sua constituição, na qual o ácido oléico é predominante (RAMOS et al., 2011). Contudo, deve-se ressaltar que o uso deste substrato inviabiliza economicamente o processo de produção enzimática. Dentre as demais fontes de carbono avaliadas, nota-se que quando a levedura L1 foi crescida em soro de queijo, uma ótima produção de lipases foi obtida (26,70 U/mL). Também é possível evidenciar a casca de abacate como boa indutora da produção de lipases pelo isolado L1, sendo a produção correspondente a 25,01 U/mL. No entanto, o melhor crescimento fúngico evidenciado pela quantidade de biomassa produzida foi verificado quando a levedura L1 foi crescida em presença de casca de butiá e óleo de mamona (Fig. 3B). Desta forma, pode-se concluir neste estudo que os níveis de lipases produzidos pela levedura L1 não estão diretamente relacionados ao seu crescimento.

Comumente, o processo de fermentação submersa tem sido empregado para a produção de enzimas lipolíticas por leveduras, empregando-se substratos hidrofóbicos de baixo custo como óleos vegetais, gordura de aves, gorduras residuais, estoques de sabão, óleo de canola, entre outros (FICKERS et al., 2004; ALMEIDA et al., 2013). O crescimento de leveduras em soro de queijo já foi previamente reportado na literatura. Andrade e Hasan (2013) constataram que o soro de queijo pode ser reutilizado em processos fermentativos como fonte de carbono e de sais minerais, a fim de proporcionar o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e a obtenção de produtos de maior valor agregado.

De acordo com Mollea et al. (2013), o emprego do resíduo de queijo em

diversos bioprocessos tem sido considerado bastante interessante e promissor, especialmente na obtenção de bioplásticos, bacteriocinas, enzimas e exopolissacarídeos.

Otimização da produção de lipases produzidas pela levedura L1 utilizando-se o DCC e o MSR

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) realizada através de Delineamento Central Composto Rotacional 2^3 fatorial foi conduzida, com o objetivo de estabelecer as condições ótimas para produção de lipases pela levedura L1, bem como verificar as interações entre concentração do soro de queijo, pH e tempo de cultivo. Os valores reais e codificados, bem como os resultados obtidos no planejamento experimental estão apresentados na Tabela 5, onde os tratamentos de 1 a 17 fazem parte do delineamento experimental, enquanto a corrida 18 refere-se à validação interna dos modelos.

A análise de variância (ANOVA) para os modelos gerados está resumida na Tabela 6. O modelo da atividade lipásica foi significativo ($p < 0,05$). Considerando-se o teste F , o modelo foi preditivo, pois o valor de F calculado foi maior do que o valor de F tabelado. O coeficiente de determinação R^2 de 0,7502 indica que 75,02% da variabilidade dos dados podem ser explicadas por este modelo, valores considerados altos ao se considerar experimentos biológicos.

Os dados obtidos foram analisados por regressão linear múltipla e o modelo matemático que representa a atividade lipásica foi expresso pela equação 2, levando-se em consideração somente os termos significativos:

$$\text{Atividade lipolítica } \left(\frac{U}{mL}\right) = 76,74 - 37,70pH - 21,24 t - 22,77[S] + 36,71 pH * [S] + 20,52 t * [S] \quad (2)$$

Onde: pH é o pH do meio de cultivo, S é concentração do soro de queijo e T é o tempo de cultivo.

Observa-se que os termos lineares das variáveis independentes de concentração do soro de queijo [S], tempo [T] e pH de cultivo [pH] foram significativos, atuando como fatores limitantes para a produção de lipases pela levedura L1. Em relação às interações entre os termos, as interações entre S e pH, bem como a interação entre S e T também foram significativas.

As condições de cultivo que apresentaram maior produção de lipases pela levedura L1 cultivada em soro de queijo foram concentração do substrato 1,1%, pH 4,0 e tempo de incubação de 24 horas (corrida 1). Os níveis de produção de lipases obtidos no presente trabalho sob condições otimizadas empregando-se o soro de queijo como substrato (267,07 U/mL) são superiores aos obtidos por Tommaso e Colaboradores (2011), quando a levedura *Candida rugosa* foi cultivada em meio contendo o soro de queijo, suplementado com Tween 80 e azeite de oliva, os quais corresponderam a 15 U/mL. Até o presente momento, apenas o estudo desses autores reporta o emprego do soro de queijo para a produção de lipases. Ressalta-se aqui, os bons níveis de produção obtidos por meio da utilização do soro de queijo como único componente do meio de cultivo para a produção de lipases pela levedura L1. De acordo com Potumarthi et al. (2008), o emprego de meios de baixo custo é importante para a viabilidade econômica da produção de lipases. Estes, ao mesmo tempo, não devem afetar negativamente sua produtividade. Desta forma, o uso do soro de queijo para a produção de lipases pela levedura L1 é bastante interessante, visto que sua utilização pode não apenas agregar valor a este resíduo, bem como diminuir substancialmente os custos de produção dessas enzimas.

Ainda, a validação dos resultados foi conduzida sob condições otimizadas, em triplicata (corrida 1, Tabela 5). Nota-se que os resultados experimentais obtidos na validação (255,83 U/mL) se aproximam dos resultados obtidos sobre as condições otimizadas inicialmente (267,07 U/mL), validando, desta forma, o modelo utilizado.

Conclusões

Nos últimos anos, o uso de microrganismos como recurso biotecnológico para a produção de enzimas industrialmente importantes tem estimulado a sua exploração. As diversas linhagens fúngicas isoladas de ambientes distintos no presente trabalho, o fungo filamentoso *Fusarium oxysporum* e a levedura L1, ambos isolados de óleo contaminado, destacaram-se por seu potencial lipolítico. Dentre diversas fontes de carbono avaliadas, bons níveis de lipases foram produzidos pela levedura L1, quando o soro de queijo foi empregado como fonte indutora. Após a otimização, uma elevada produção foi observada, sendo esta 10 vezes superior à observada inicialmente. O emprego deste resíduo na produção de lipases mostra-se particularmente interessante, visto que ganhos ambientais e econômicos poderão ser obtidos a partir de sua utilização.

Referências

- ABADA, E. A. E. Production and characterization of a mesophilic lipase isolated from *Bacillus stearothermophilus* AB-1. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 11,p. 1100-1106. 2008.
- ABD RAHMAN, R. N. Z. R. et al. *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 77, jan. 2007.
- ALMEIDA, A. F.; TAULK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1225-1234, 21 dez. 2012.
- ALMEIDA, A. F.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid lipase from *Candida viswanathii*: production, biochemical properties, and potential application. **BioMed research international**, v. 2013, p. 435818, jan. 2013.
- ANDRADE, K. DE; HASAN, S. D. M. V Simpósio de Engenharia Química 06 a 10 de maio de 2013 Maringá – Paraná. **Anais...** p. 1–11, 2013.
- BALDASSO, C.; TESSARO, I. C.; RUVIER, G. S. Desmineralização do soro de leite através da eletrodialise. In: Seminário do Programa De Pós-Graduação em Engenharia Química, 2009, Porto Alegre. **Anais...** VIII Oktoberforum – PPGEQ, 2008.
- BLACKWELL, M. The Fungi: 1,2,3 ... 5,1 million species? **American Journal of Botany**. v. 98, p. 426-438. 2011.
- BUSSAMARA, R.; FUENTEFRIA, A. M.; OLIVEIRA, E. S.; BROETTO, L.; SIMCIKOVA, M.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plan scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 268-275, 2010.
- CAMARGO-DE-MORAES, M.M; RAMOS, S.A.F.; PIMENTEL, M.C.B.; MORAIS Jr., M.A.; LIMA FILHO, J.L. Production of an extracellular polysaccharide with

emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 191-194, 2003.

CIAFARDINI, G. Ã.; ZULLO, B. A.; IRIDE, A. ARTICLE IN PRESS Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. **Food Microbiology**, v. 23, p. 60–67, 2006.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Belo Horizonte, 206 p., 2006. Tese (Programa de pós-graduação nível doutorado em Ciências de alimentos Faculdade de Farmácia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006.

COUTO, F. A. et al. Diversity and association of filamentous fungi in coffee beans under organic and conventional cultivation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 26, p. 2505–2512, 2014.

FICKERS P.; NICAUD, J.M; GAILLARDIN, C.; DESTAIN, J.; THONART, P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 4, p. 742-749, 2004.

FREGOLENTE, P. B. L. et al. Screening of microbial lipases and evaluation of their potential to produce glycerides with high gamma linolenic acid concentration. **Brazilian journal of microbiology** : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], v. 40, n. 4, p. 747-56, out. 2009.

GARCÍA-LEPE, R. et al. Lipases in autolysed cultures of filamentous fungi. **Letters in applied microbiology**, v. 25, n. 2, p. 127-30, ago. 1997.

GONÇALVES, C. et al. Use of olive mill wastewater by lipolytic yeasts. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 2, p. S179, set. 2007.

HANKIN, L. ANAGNOSTAKIS, S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycology**, v. 67, p. 597-607, 1975.

HASAN, F.; Shah A. A.; Javed S., Hameed A. Enzymes used in detergents : Lipases. **African Journal of Biotechnology**. Paquistão, v. 9, n. 31, p. 4836-4844, Ago. 2010.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, jun. 2006.

HOSHINO, T., SHIMIZU, S., WATANABEE, YUICHI, W., NAGASAWA, T. AND YAMANE, T. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. lini. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 56, p. 660-664. 1992

KIM, H-R.; KIM, I-H.; HOU, G.T.; KWON, K-I. SHIN, B-S. Production of a novel cold active lipase from *Pichia lynnferdii* Y-7723. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 1322-1326, 2010.

KLOFUTAR, B.; GOLOB, J. Microorganisms in Diesel and in Biodiesel Fuels. **Acta Chimica Slovenica**. vol. 54. p.744-748. 2007

KUMAR, S. S.; GUPTA R. An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of henyl ethyl acetate. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1054–1060, 2008.

LACAZ, C da S, et al. **Fungos actinomicetos e algas de interesse médico**. Sarvier, São paulo, 1998, p. 445.

LEITE, M.T. et al. Canonical analysis technique as an approach to determine optimal conditions for lactic acid production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. **International Journal of Chemical Engineering**, v.2012, ID 303874, 9p, 2012.

LIZIEIRE, R. S.; CAMPOS, O. F. Soro de queijo “in natura” na alimentação do gado de leite. Instrução técnica para o produtor de leite. 2ª Edição. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2006.

MAFAKHER, L. et al. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. **New biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 337-340, 30 set. 2010.

MALDONADO, R. R. et al. Lipase Production Using Microorganisms from Different Agro-Industrial By- Products. **International Journal of Applied Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 108-115, 2014.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 30 set. 2011.

MOLLEA, C.; MARMO, L.; BOSCO, F. Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. In: MUZZALUPO, I. (Ed.). **Food industry**. New York: Intech, 2013.

MORAIS, A. DE et al. Bebidas lácteas com soro de queijo e frutas. **Ciência rural**. v. 43. p. 1693-1700, 2013.

OGAWA, J., A. RYONO, S.-X. XIE, R.M. VOHRA, R. INDRATI, H. MIYAKAWA, T. UENO, Y. IKENAKA, H. NANBA, S. TAKAHASHI AND S. SHIMIZU. β -Carbon stereoselectivity of *N*-carbamoyl-D- α -amino acid amidohydrolase for α,β -diastereomeric amino acids. **Applied MicrobiolyBiotechnology**, v. 52 ,p. 797-801, 1999.

OGBO, E. M; TABUANU, A; UBEBE, R. Phytotoxicity assay of diesel fuel-spiked substrates remediated with *Pleurotus tuber-regium* using Zeamays. **International Journal of Applied Research in Natural Products. International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 3. p. 12-16, 2010.

PAQUES F. W, MACEDO G. A. Lipases of plants latex: properties and industrial applications. **Química Nova**. v. 29, p. 93-99, 2006.

PRAZERES, J. N. ; CRUZ, J. A. B.; PASTORE, G. M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 505-509,

2006.

POTUMARTHI et al. Effect of Aeration and Agitation Regimes on Lipase Production by Newly Isolated *Rhodotorula mucilaginosa*–MTCC 8737 in Stirred Tank Reactor Using Molasses as Sole Production Medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p.700-710, 2008.

QUADROS, C.P.; BICAS, J.L.; NERI-NUMA, I.A.; PASTORE, G.M. Producing alkaline lipase by *Fusarium oxysporum* using unconventional medium components. **Food Science and Biotechnology**, v. 18, n. 6, 4 p., 2009.

RAMOS, L. P. et al. Tecnologias de Produção de Biodiesel. **Revista Virtual Química**, v. 3, n. 5, p. 385–405, out. 2011.

RAPP, P. et al. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* sp. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 17, p.832-838, 1995.

RIFAAT, H. M.; EL-MAHALAWY, A. A; EL-MENOFY H. A.; S. A. DONIA. Production , optimization and partial purification of lipase from *Fusarium oxysporum*. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**. v. 5, n. 1, p. 39–53, Fev. 2010.

RODRIGUES, C. **Seleção De Fungos Produtores De Lipases A Partir De Resíduos Oleosos Derivados Do Saneamento Ambiental**. Vitória, 195 p., 2011. Tese (Programa de Pós-graduação em engenharia ambiental) Universidade federal do espírito santo, Centro Tecnológico, Vitória, Espírito Santo, 2011.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al. Evaluation of growth in diesel fuel and surfactants production ability by bacteria isolated from fuels in Costa Rica. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 32. p 116-120, 2012.

SAAD, M.; KANSOH, L.; GADALLAH, M. A. Optimization of extracellular lipase production by. **Arabian Journal Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 19–28, 2005.

SALIHU, A., ALAM, M.Z., ABDULDARIM, M.I.; SALLEH, H.M. Lipase production: as insights in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44, 2012.

SEDMAK, J. J.; GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250, **Analytical Biochemistry**, v. 79, 544-552, 1977.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; CHAND, U. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627–662, 2001.

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic solvent tolerant lipases and applications. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 625-658, jan. 2014.

SPALATELU, C. Biotechnological valorization of whey. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 10, p. 1-8, 2012.

SRIMHAN, P. et al. Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 3, p. 293–8, 7 mar. 2011.

ST- GERMAIN G., SUMMERBELL, R. **Identifying filamentous fungi: A clinical laboratory handbook**. Editora Star. Califórnia, USA. 1996. p. 314.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 182-196, 2010.

TOMMASO G. et al. Production of Lipase from *Candida rugosa* Using Cheese Whey through Experimental Design and Surface Response Methodology. **Food and Bioprocess Technology**. vol. 4(8), p.1473-1481

TOMIYA, P. et al. Quanto À Capacidade De Produzir Lipase E Xilanase. In: Congresso de Iniciação Científica da UFPE, Pernambuco. **Anais...Pernambuco**, 2008, p. 2–5.

VARGA, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri. **Studies in Mycology**, v. 69, p.1-17. 2011.

VIBHA, B.; NEELAM, G. Importance of Exploration of Microbial Biodiversity. **ISCA Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 3, p. 78–83, 2012.

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbial Genetics Bull.**, v. 13, p. 42-43, 1956.

YANG, J.; KOGA, Y.; NAKANO, H.; YAMANE, T. Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through in vitro combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site. **Protein Engineering**, v. 15, p. 147-152, 2002.

Figuras e Tabelas

Tabela 1- Linhagens de fungos filamentosos e leveduriformes isolados a partir de diferentes ambientes.

Origem de isolamento	Linhagens	
	Leveduriformes	Filamentosas
Águas residuais Frigorífico 1	JC1, JC2, JC4, JC5, M2, M4, M5, M6, M7, S2, S5, S6, S7, S8, S9,	M10, M8, S1, S10, S12, S3,
Águas residuais Frigorífico 2	N2, N3, N9, N10, N11, T2, T3, T5	D1, D2, D3, D4, D6, N1, N4, N5, N6, N7, N8, T1, T4, T6.
Sabão contaminado	-	AS1, AS2, AS3
Óleo contaminado	L1, L3.	BV.
Ovas de Peixe	LP1, LP2, LP3, LP4, LP5, LP6,	-

Tabela 2 - Identificação ao nível de gênero das linhagens de fungos filamentosos isoladas de diferentes ambientes obtida por meio da análise de características macro e micromorfológicas segundo chave de identificação de St-Germain e Summerbell (1996) e Heins-Vaccari Takahashi de Melo (1998).

Linhagem de fungo filamentososo isolada	Gênero identificado
S1	<i>Geotrichum</i> sp.
S12	<i>Cladosporium</i> sp.
N4,N5,T4,AS1, D4	<i>Aspergillus</i> sp.
M8,N8,T1,T6,AS2	<i>Penicillium</i> sp.
S10,N7,AS3, AS4	<i>Mucor</i> sp.
M10	<i>Scopulariopsis</i> sp.
D1	<i>Trichophyton</i> sp.
D2,D6	<i>Scedosporium</i> sp.
D3	<i>Sporotrix</i> sp.
N1	<i>Rhizopus</i> sp.
BV	<i>Fusarium</i> sp.
N6	Não identificado

Tabela 3 - Índice enzimático das leveduras produtoras de lipases obtido por meio do teste de indução em placa em presença dos indutores azeite de oliva, Tween 20 e Tween 80.

Linhagem	Substratos		
	Azeite de oliva	Tween 20	Tween 80
	DH/DC	DH/DC	DH/DC
L1	1,52	2,08	3,51
L3	1,15	3,3	2,35
M6	2,35	1,73	1,8
T3	0	3,71	2,08
LP2	1,31	2,87	1,23
T5	1,51	2,12	1,67
JC1	2,31	1,15	1,6
LP5	0	1,75	3,31
M2	1,45	1,55	1,96
M5	1,99	1,5	1,4
LP1	1,44	2,01	1,31
M7	1,46	1,44	1,72
T2	1,88	1,14	1,59
S6	1,61	1,6	1,41
JC5	1,45	1,53	1,54
LP4	0	2,46	1,95
S5	1,69	1,29	1,44
LP6	1,33	1,4	1,65
S7	1,43	1,07	1,85
JC2	1,29	1,75	1,2
N5	1,48	1,07	1,4
S9	0	2,1	1,56
N9	1,25	1,25	1,08
N11	1,24	1,18	1,11
N10	1,25	1,11	1,12
S8	0	1,55	1,31
S2	0	1,23	1,61
LP3	1,25	0	1,43
N2	1,45	1,14	0
JC4	1,29	0	1,16
M4	0	1,07	1,09
N3	0	0	0

DH: diâmetro do halo de degradação; DC: diâmetro do halo da colônia.

Tabela 4 - Seleção de leveduras produtoras de lipases inoculadas em meio líquido de Vogel suplementado com 10% de azeite de oliva.

Linhagem leveduriforme	Atividade lipásica (U/ml)	Atividade específica (U/mg proteína)
L1	45,92±0,001	168,20±8,39
L3	3,63±0,002	16,96±0,23
JC1	0,283±0,001	1,28±0,183
M2	0,0080±0,003	0
LP1	0,0033±0,001	0
T5	0,0027±0,003	0
LP5	0,0016±0,001	0
LP2	0,0015±0,002	0
M6	0,0007±0,001	0

Figura 1 - Seleção de linhagens de fungos filamentosos produtores de lipases inoculadas em meio líquido de Vogel suplementado com 10% de azeite de oliva. (A) Produção de lipases em U/mL. (B) Atividade específica em U/mg proteína.

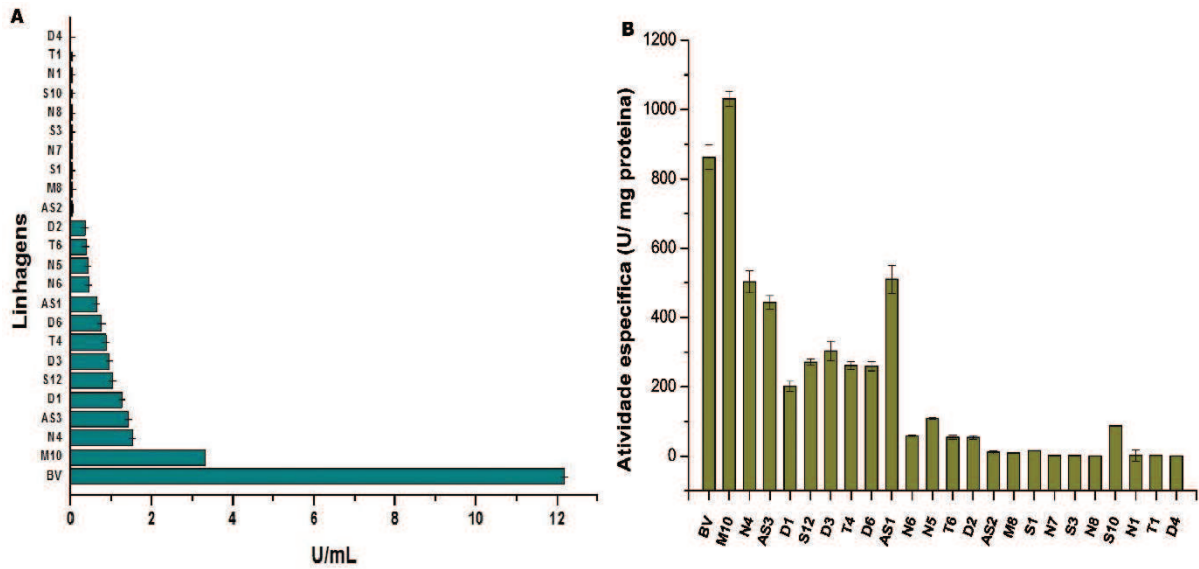


Figura 2 – Crescimento de linhagens fúngicas filamentosas produtoras de lipases quando crescidas em meio líquido de Vogel suplementado com 10% de azeite de oliva.

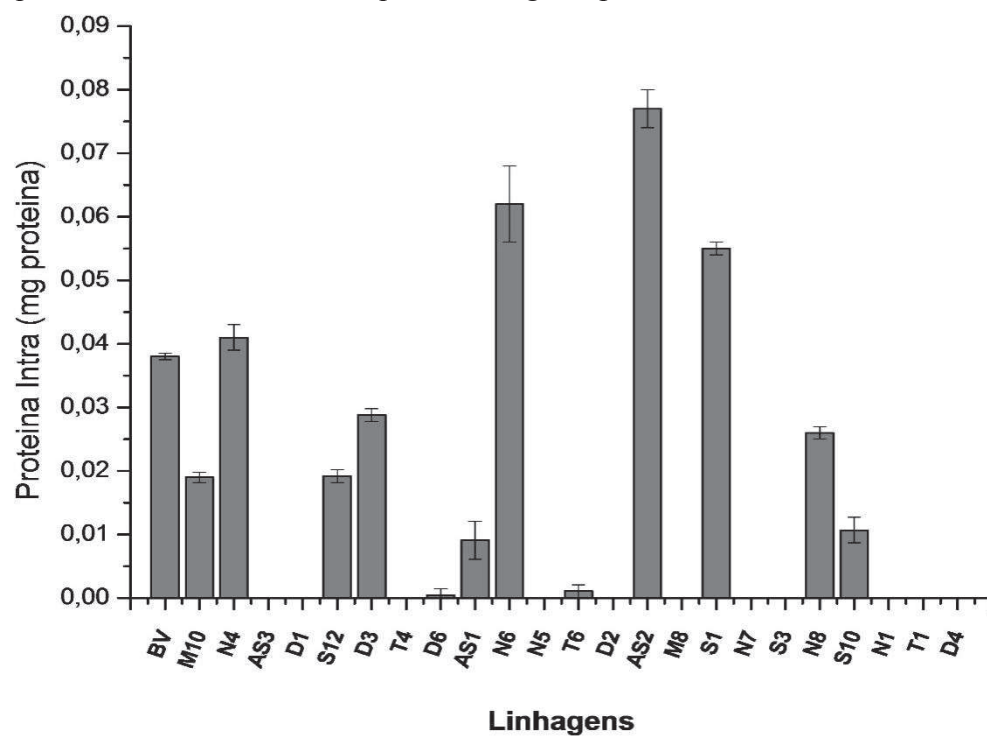


Figura 3 - Seleção de fontes de carbono indutoras da atividade lipásica pela levedura L1. (A) Atividade lipásica (U/mL) em diferentes substratos; (B) Biomassa fúngica (mg).

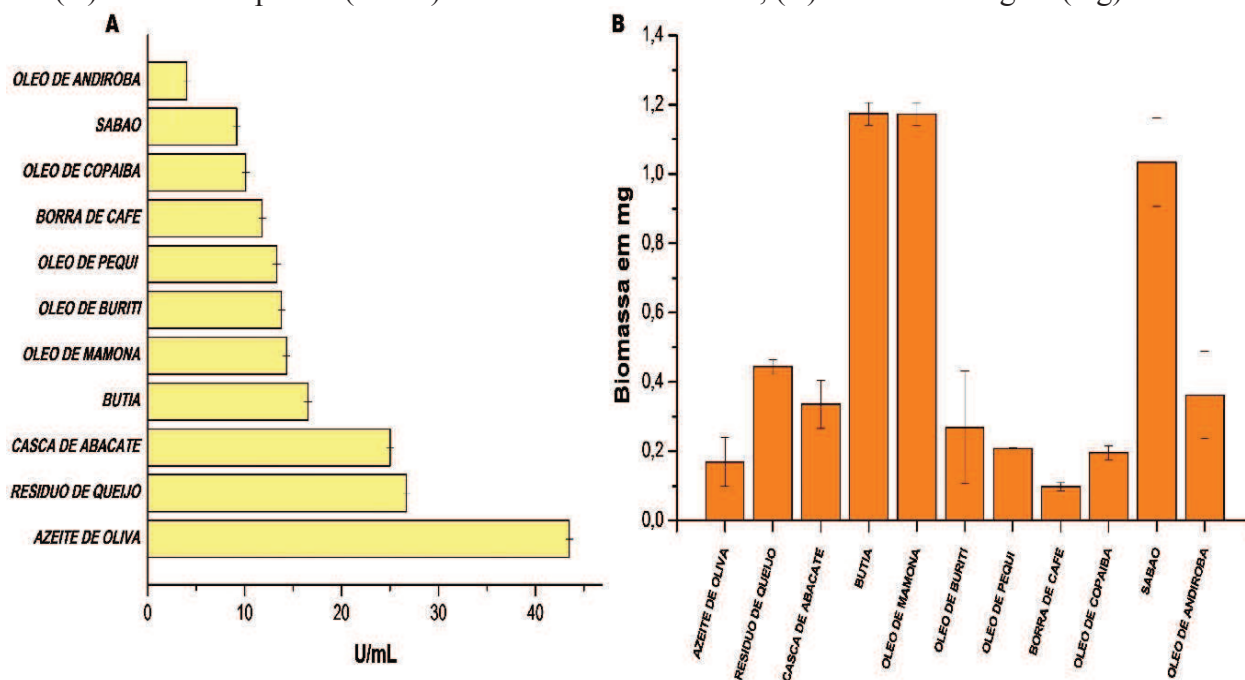


Tabela 5 - Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para produção de lipases pela levedura L1.

Corrida	Valores reais (codificados)			
	Substrato (%)	pH	Tempo (horas)	Atividade Lipásica (U/mL)
1	1,1 (-1)	4,0 (-1)	24 (-1)	267,07±6,454
2	1,1 (-1)	4,0 (-1)	78 (1)	19,00±6,111
3	1,1 (-1)	7,0 (1)	24 (-1)	80,78±4,513
4	1,1 (-1)	7,0 (1)	78 (1)	34,74±1,203
5	2,9 (1)	4,0 (-1)	24 (-1)	31,20±0,446
6	2,9 (1)	4,0 (-1)	78 (1)	78,17±3,417
7	2,9 (1)	7,0 (1)	24 (-1)	78,69±0,902
8	2,9 (1)	7,0 (1)	78 (1)	27,79±1,592
9	0,5 (-1,68)	5,5 (0)	51 (0)	25,71±0,601
10	3,5 (1,68)	5,5 (0)	51 (0)	35,17±0,714
11	2,0 (0)	3,0 (-1,68)	51 (0)	28,36±0,178
12	2,0 (0)	8,0 (1,68)	51 (0)	36,83±2,462
13	2,0 (0)	5,5 (0)	5,6 (-1,68)	19,08±0,644
14	2,0 (0)	5,5 (0)	96,4 (1,68)	22,07±0,893
15	2,0	5,5 (0)	51 (0)	42,39±0,893
16	2,0	5,5 (0)	51 (0)	42,91±0,300
17	2,0	5,5 (0)	51 (0)	48,64±1,311
18*	1,1	4,0	24	255,84±1,203

*Validação interna em triplicata

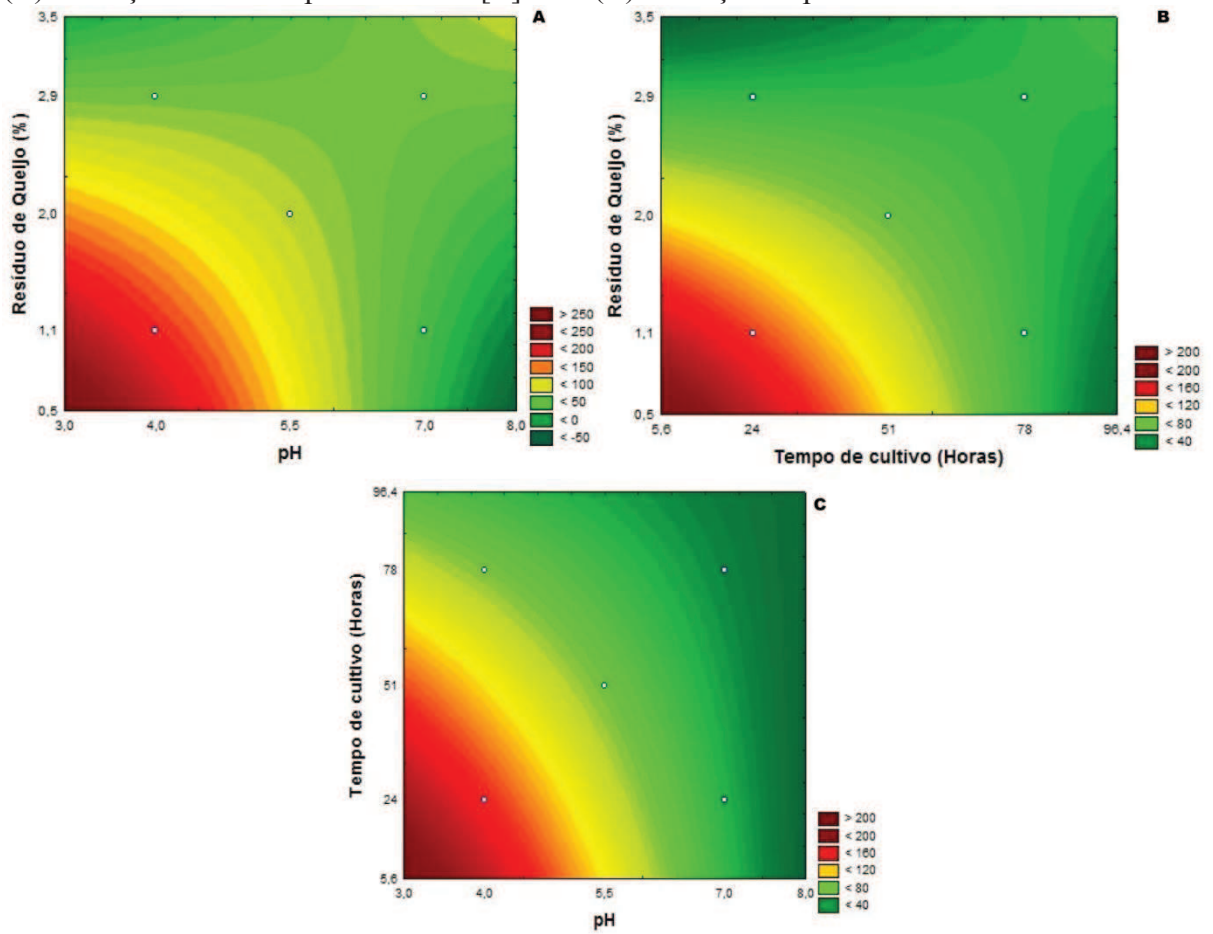
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão de lipases produzida pela levedura L1 cultivada em soro de queijo, e os valores de R^2 e F-valor.

Produção de lipases							
Termos	SQ	GL	QM	<i>F</i>	<i>F tab</i>	<i>F/Ftab</i>	<i>R</i> ²
M	104182,24	5	20836,45	10,81	4,25	2,54	75,02
R	34685,46	18	1926,97				
T	138867,70	23					

Termos	Coeficientes	<i>p</i> -valor
Média/Intercep	76,7403	0,000000
pH	-75,3914	0,000766
Tempo	-42,4780	0,034147
[S]	-45,5519	0,024388
pH x Tempo	26,9255	0,162490
pH x Substrato	73,4276	0,000964
Tempo x Substrato	41,0354	0,039887

M = modelo; R = resíduo; T = Total; SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados; gl: grau de liberdade; *F*: *F* calculado; *F tab*: *F* tabelado 5%; [S]: concentração do substrato; T: tempo; pH: potencial hidrogeniônico. Os valores em negrito são estatisticamente significativos.

Figura 4 - Superfície de contorno para a produção de lipases pela levedura L1 cultivada em soro de queijo; (A) interação pH de cultivo [pH] x concentração do substrato [S]; (B) interação entre Tempo de cultivo [T] x S e (C) interação TxpH.



Capítulo II

Casca de Butiá (*Butia odorata*) como substrato alternativo para a produção de lipases por *Fusarium oxysporum*

Resumo

Dentre as enzimas industriais, as lipases se destacam por possuírem inúmeras aplicações biotecnológicas. A presente pesquisa objetivou elevar os níveis de produção lipases por uma linhagem de *Fusarium oxysporum* isolada a partir de óleo contaminado. Adicionalmente, as enzimas produzidas foram bioquimicamente caracterizadas. O efeito da concentração do substrato, do pH e do tempo de cultivo sobre a produção de lipases foi avaliado, empregando-se o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) aplicável a Metodologia de Superfície de Resposta. Dentre as diversas fontes de carbono avaliadas, a casca de buitá foi o melhor substrato indutor, obtendo-se uma produção correspondente a 17,45 U/mL. Após a otimização, as melhores condições estabelecidas para a produção de lipases por *F. oxysporum* foram 2,9% de casca de butiá, pH de cultivo 4,2 e tempo de cultivo de 4,4 dias, elevando-se os níveis de lipases produzidos para 35,82 U/mL. As lipases de *F. oxysporum* foram mais ativas em pH 7,5 e a 45-50°C, apresentando-se particularmente estáveis a 45 °C e na faixa de pH 5,5-7,5. Em relação ao efeito de diferentes substâncias, as lipases foram notavelmente ativadas por β -mercaptoetanol e pelos íons Ca^{+2} , enquanto que o citrato de sódio, EDTA, Mg^{+2} e o Pb^{+3} atuaram como inibidores destas enzimas. Os surfactantes CTAB e SDS foram capazes de ativar a atividade enzimática, revelando seu potencial de aplicação na indústria de detergentes. Esse efeito ativador também foi observado em hexano a 20%, sendo que em maiores concentrações, bem como em relação a outros solventes avaliados, uma inibição da atividade enzimática foi constatada. Adicionalmente, a elevada atividade de esterificação das lipases de *F. oxysporum* sobre o óleo de andiroba sugere sua aplicabilidade no processo de produção de biodiesel a partir desse substrato. O uso da casca de butiá como substrato para a produção de lipases é uma alternativa interessante, a fim de viabilizar economicamente a produção destas enzimas.

Palavras-chave: enzimas lipolíticas, delineamento composto central, caracterização bioquímica, atividade de esterificação.

Abstract

Among the industrial enzymes, lipases take an important place, due to the numerous biotechnological applications of these enzymes. The objective of this work was to elevate the lipases levels produced by a *Fusarium oxysporum* strain, isolated from contaminated oil. In addition, the enzymes produced were biochemically characterized. The effect of substrate concentration, pH of medium and cultivation time on lipases production was evaluated, employing Central Composite Rotatable Design (CCRD) applicable to Surface Response Methodology (SRM). Among the different carbon sources evaluated, the butia peel was the best inducer substrate, with a lipase production corresponding to 17.45 U/mL. Through optimization, the best conditions established for lipase production by *F. oxysporum* were 2.9% of butia peel, pH of medium 4.2 and cultivation time of 4.4 days, reaching an elevation of lipases levels produced corresponding to 35.82 U/mL. The *F. oxysporum* lipases were more active at pH 7.5 and 45-50 °C, showing great stability at 45 °C and in the pH range 5.5 to 7.5. Regarding the effect of distinct substances, the lipases were notably activated by β -mercaptoethanol and by the ion Ca^{2+} , whereas sodium citrate, EDTA, Mg^{2+} and Pb^{3+} acted as inhibitors of these enzymes. The CTAB and SDS surfactants were able to activate the enzyme activity, revealing their potential of application in detergent industries. A lipase activation was also observed in the presence of hexan 20%. In higher concentrations of hexan, as well in relation to other solvents evaluated, an enzyme activity inhibition was observed. Additionally, its high esterification activity on the ondiroba oil suggests its applicability in the biodiesel production process from this substrate. The use of butia peel as substrate for lipase production is an interesting alternative, in order to make economically viable the production of these enzymes.

Key-words: lipolytic enzymes, central composite design, biochemical characterization, response surface methodology.

Introdução

O interesse pela tecnologia de enzimas tornou-se ao longo dos anos um dos campos mais promissores dentro da Biotecnologia. Estima-se, atualmente, que dentre cerca de 4000 enzimas conhecidas, apenas 200 sejam comercialmente usadas, sendo seu mercado mundial estimado em 4 bilhões de dólares (NOVOZYMES, 2011; SHARMA; KANWAR, 2014). Por serem biocatalizadores, as enzimas oferecem oportunidades de processos mais limpos em diversos segmentos industriais, o que justifica seu considerável interesse por pesquisas e sua aplicação comercial.

Cerca de 75% de todas as enzimas industriais em todo o mundo são hidrolases e destas, 90% são produzidas por microrganismos. Depois das proteases e carboidrases, as lipases constituem o terceiro maior grupo em vendas no mundo (SHARMA et al., 2014). Segundo Treichel et al. (2009), as lipases tem emergido como um dos principais biocatalisadores, contribuindo de forma significativa no mercado multibilionário de enzimas. Por apresentarem características multifuncionais, as lipases são utilizadas em vários setores industriais, como fabricação ou melhoramento de detergentes (HASAN et al., 2010); tratamento de efluentes diversos (CASTRO et al., 2004); panificação e alimentos (KIM et al., 2006; LARIOS et al., 2004; CARVALHO et al., 2005); produção de medicamentos, cosméticos, produtos de valor nutricional e também na produção de biodiesel (BAJAJ et al., 2010; MESSIAS et al., 2011).

As aplicações industriais das lipases se justificam em razão da principal função que estas enzimas apresentam, a de promover a hidrólise de ésteres de triacilgliceróis com cadeia carbônica com mais de dez átomos liberando diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol. Porém, outras funções são desempenhadas pelas lipases, como a atividade de esterificação, a qual permite a reversão da hidrólise, catalisando reações de transesterificação (interesterificação, alcoólise e acidólise), a síntese de aminas e a lactonização. Essas reações são verificadas quando uma baixa atividade de água ocorre no meio reacional, sendo extensivamente utilizadas na indústria (PAQUES e MACEDO, 2006; COLLA et al., 2012).

A produção de lipases por microrganismos vem sendo reportada em diversos estudos, devido a versatilidade de suas propriedades bioquímicas, especificidade ao substrato, bem como à facilidade de manutenção e obtenção desses organismos (SHARMA et al., 2014, ALMEIDA et al., 2013). Os fungos filamentosos são os

microrganismos que apresentam maior diversidade. Nos últimos anos, estes microrganismos vêm ganhando destaque em relação a produção de enzimas, em virtude de aspectos de sua morfologia, adaptação, atributos fisiológicos e químicos (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). Diversos fungos pertencentes a gêneros distintos tem demonstrado um bom potencial de produção de lipases (SINGH e MUKHOPADHYAY, 2012).

Um grande número de pesquisas realizadas com a produção de lipases por fungos do gênero *Fusarium* é encontrada na literatura, sendo estas espécies então conhecidas por suas enzimas apresentarem algumas propriedades interessantes, tais como estabilidade em solventes orgânicos polares como o etanol, a acetona e o n-propanol (CAMARGO-de-MORAIS et al., 2003). *Fusarium oxysporum* é uma espécie com ampla distribuição geográfica, podendo ser sapróbia de solos, de plantas apodrecidas, endofítica e algumas vezes considerada fitopatogena. Dentro do gênero *Fusarium*, é a espécie que mais apresenta pesquisas relacionadas e aplicações industriais. Estudos envolvendo a produção de enzimas celulíticas e hidrolíticas por este microrganismo tem sido mais frequentemente reportados na literatura (BADENES et al., 2010; MANNESSE et al., 1995; PANAGIOTOU et al., 2003; SUN et al., 1997 e 1998; HOSHINO et al., 1992; MAIA et al., 1999). Em relação à produção de lipases, diversos estudos descrevem o fungo *F. oxysporum* como ótimo produtor da referida enzima (PRAZERES et al., 2006; KAKDE, 2011; MALDONADO et al., 2014).

As lipases microbianas são induzíveis, assim são geralmente produzidas na presença de um lipídeo, como óleos diversos (óleo de canola, óleo de soja, azeite de oliva, ou azeite de palma), os quais apresentam o ácido oléico como principal componente (TREICHEL et al., 2009). Nos últimos anos, o uso de resíduos agroindustriais como substratos indutores de lipases tem aumentado significativamente, uma vez que fontes puras inviabilizam economicamente a sua produção (PABLINE et al., 2014).

Em um estudo prévio envolvendo a seleção de 54 fungos quanto ao seu potencial de produção de lipases, uma linhagem de *F. oxysporum* destacou-se por apresentar elevados níveis de produção dessas enzimas. Diante do exposto acima, o presente estudo visou estabelecer as melhores condições de cultivo desta linhagem de *F. oxysporum* para a produção de lipases em fermentação submersa, empregando-se o Delineamento Central Composto (DCC) aplicável a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Adicionalmente, as lipases produzidas sob condições ótimas foram caracterizadas bioquimicamente.

Material e Métodos

Preparo dos resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais avaliados como fontes indutoras da produção de lipases por *F. oxysporum* no presente estudo foram obtidos localmente e estão indicados na tabela 1. Estes foram lavados exaustivamente com água destilada, secos a 40-80 °C e peneirados (35 mesh). Após esse procedimento, foram armazenados em locais livres de umidade.

Caracterização da casca de butiá por infravermelho

Espectros no infravermelho no modo de refletância difusa foram coletados com a utilização do espectrômetro da Perkin Elmer[®], equipado com acessório refletância difusa Frontier, na faixa espectral compreendida entre 400 e 4000 cm⁻¹, utilizando-se resolução de 2 cm⁻¹ com acumulações de 32 varreduras para cada espectro. Na aquisição dos espectros denominado branco, por DRIFTS, utilizou-se o brometo de potássio (KBr), compactado no acessório reflexão difusa. As amostras e o KBr foram pesadas com o auxílio de uma balança analítica SHIMADZU, modelo AX200. Três amostras de farelo de casca butiá (*Butia odorata*) foram corridas no espectrômetro de infravermelho médio.

Determinação da atividade lipásica e de proteínas totais

A atividade lipásica foi determinada segundo o método proposto por Yang et al. (2002), por meio da incubação do filtrado de cultura em meio tamponado com substrato de *p*-nitrofenil palmitato 0,5mM. Este foi inicialmente solubilizado em DMSO e posteriormente diluído 20 vezes em tampão McIlvaine pH 7,0 em presença de triton X-100 a 0,5%. A fim de compor o volume reacional, 0,1 mL da enzima propriamente diluída em tampão McIlvaine pH 7,0 foram adicionados a 0,9 mL do substrato. Em intervalos de tempos pré-estabelecidos, a reação foi interrompida pela adição de tetraborato de sódio e a leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro a 405 nm.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Além da quantificação desta atividade, a determinação dos teores de proteínas intra e extracelulares foi realizada, de acordo com o método colorimétrico de Bradford modificado, utilizando a soro albumina bovina como padrão (SEDMAK e GROSSBERG, 1977).

Microrganismo e Condições de Cultivo

A linhagem de *F. oxysporum* empregada neste estudo pertence à coleção de microrganismos do departamento de Ciências Biológicas da Unicentro, Guarapuava-PR, a qual foi isolada a partir de óleo contaminado.

Inicialmente, o fungo *F. oxysporum* foi cultivado em meio sólido de Vogel (1956), contendo 1,5 % de glicose e 1,5% ágar, mantido a uma temperatura de 28 °C, durante sete dias para produção de esporos. Após este período, os conídios foram suspensos em água destilada esterilizada, sendo a suspensão filtrada em lã de vidro estéril para a remoção dos fragmentos de hifas e suas concentrações ajustadas em câmara de Neubauer para $1,0 \times 10^7$ esporos/mL. Um mililitro desta suspensão foi inoculado em frascos Erlenmeyersde 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido de Vogel, em pH 6,5, suplementados com 1% de azeite de oliva. Após o crescimento em meio líquido por 5 dias, as culturas foram filtradas a vácuo em funil de Büchner. Desta forma, os filtrados do meio de cultivo livre de células e o micélio foram obtidos, os quais foram utilizados como fonte de enzimas e de proteínas intracelulares, respectivamente.

Avaliação de diferentes fontes de carbono na produção de lipases

Afim de avaliar o potencial de indução de lipases, 34 substratos incluindo fontes de carbono puras e resíduos agroindustriais foram testados. O fungo foi cultivado em meio sólido de Vogel suplementado com 1% das diferentes fontes de carbono, a 28°C, por 7 dias.

Otimização da Produção de lipases utilizando o DCCR e a MSR, empregando-se a casca de butiá como substrato.

Com o intuito de elevar os níveis de lipases produzidas por *F. oxysporum*, as condições de cultivo foram avaliadas por meio do empregado DCC e as respostas das atividades de lipases foram analisadas pela MSR. Os experimentos foram realizados por 2³ fatorial: concentração do casca de butiá [S], pH do meio de cultivo [pH] e tempo de incubação (T), com cinco níveis, gerando 18 combinações de tratamentos com três amostras no ponto central e seis pontos axiais. A corrida 19 foi utilizada como validação interna nos modelos quadráticos gerados, realizada em triplicata.

Os dados apresentados foram ajustados de acordo com a seguinte equação polinomial de segunda ordem (equação 1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \varepsilon \quad (1)$$

Onde Y é a resposta prevista; β_0 representa a interseção; β_1 , β_2 e β_3 são os coeficientes lineares, β_{11} , β_{22} e β_{33} são os coeficientes quadráticos; β_{12} , β_{13} e β_{23} são os coeficientes de interação e x_1 , x_2 e x_3 , são as variáveis independentes, concentração do resíduo [S], tempo de incubação (T) e pH, respectivamente. O termo ε representa o erro experimental.

A análise de variância (ANOVA) e as superfícies de resposta para os experimentos de otimização foram gerados pelo programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, USA).

Caracterização Enzimática

A fim de estabelecer a temperatura ótima das lipases produzidas nas condições ótimas previamente selecionadas, a atividade enzimática foi avaliada em uma faixa de temperatura de 25 °C a 70 °C, em intervalos de 5 °C, em tampão McIlvane pH 7,0. O pH ótimo da atividade enzimática foi avaliado em tampão McIlvane na faixa de pH de 3,0 a 6,5, em intervalos de 0,5 unidades, sob temperatura ótima previamente estabelecida.

A estabilidade térmica das lipases produzidas por *F. oxysporum* foi determinada após incubação do extrato bruto a 45 °C, 50 °C e 55 °C, em diferentes intervalos de tempo, em pH ótimo. A fim de avaliar a estabilidade enzimática frente ao pH, o extrato bruto diluído (1:2 v/v) em tampão McIlvane foi incubado em diferentes valores de pH (3,0- 8,0) a 4 °C. Após 24 horas, a atividade residual das lipases foi determinada como descrito previamente.

O efeito de alguns íons nas concentrações de 2 mM e 10 mM sobre a atividade lipásica foi verificado. A estabilidade em solventes orgânicos e surfactantes também foi avaliada após a incubação a 4 °C, por 1 h, e agitação a cada 15 min. Dentre os solventes avaliados podem ser citados o glicerol, DMSO; metanol; etanol; acetona; 1-propanol; octano; butanol; tolueno; xilol; hexano, todos nas concentrações de 20-80%. Posteriormente, as reações enzimáticas foram conduzidas nas condições ótimas previamente estabelecidas.

Atividade de esterificação

A atividade de esterificação foi avaliada segundo a metodologia de Menocin et al., (2010) modificada, utilizando óleos de diferentes fontes como substrato. Para tal, 100µL do filtrado bruto, 900 µL de tampão McIlvaine pH 7,0 e 4 ml de diferentes óleos foram incubados a 55°C por 1 hora, sob agitação constante. Essa reação foi paralisada utilizando-se uma solução de acetona/etanol na proporção 1:1. A atividade de esterificação foi medida pela titulação de ácidos graxos liberados com uma solução de NaOH (0,05 mol/L), usando-se a fenolftaleína como indicador. A determinação da atividade enzimática foi realizada de acordo com a seguinte equação:

$$Ae = \frac{(Vn - Vb)M}{t \cdot vc}$$

Onde

Ae= atividade de esterificação (U/mL)

Vn= volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL)

Vb= volume da amostra usada na reação(mL)

M= Concentração de NaOH em mol/L

t= tempo de reação

vc= volume de enzima utilizado(mL)

Resultados e Discussão

Estabelecimento da melhor fonte indutora da produção de lipases por *F. oxysporum*

Com o propósito de induzir a produção de lipases pelo fungo *F. oxysporum*,

diferentes fontes de carbono ricas em ácidos graxos foram testadas (Tabela 1). O substrato azeite de oliva foi utilizado como referência, demonstrando ser ótimo indutor da referida enzima (12,16 U/mL). Ainda, dentre as fontes avaliadas, a casca de butiá e o soro de queijo também apresentaram bom potencial de indução de lipases, obtendo-se uma produção correspondente a 17,45 U/mL e 10,63 U/mL. A maior atividade específica foi obtida por meio da utilização do soro de queijo, correspondendo a 810,66 U/mg proteína. O melhor crescimento fúngico, evidenciado pela quantidade de biomassa produzida, foi verificado quando a linhagem de *F. oxysporum* foi crescida em presença de ácido palmítico, correspondendo a 0,232 mg proteína. Bons níveis de atividade também foram obtidos quando a borra de café, o sabão, o óleo de motor usado, a casca de abacate e a casca de café foram empregadas como substratos indutores. As demais fontes avaliadas não foram capazes de induzir níveis significativos de lipases pelo referido fungo.

Ressalta-se, aqui, que bons níveis de lipases foram alcançados quando a casca de butiá foi empregada como único constituinte do meio de cultura, o que acarreta uma diminuição dos custos de produção destas enzimas. Na região sul do Brasil, o gênero *Butia* destaca-se dentro da família botânica Arecaceae (Palmae), apresentando espécies de valor ecológico, econômico e industrial. Esse gênero é representado principalmente pelas espécies de *Butia odorata*, *Butia capitata*, *Butia paraguayensis* e *Butia yatay*, as quais são produtoras de frutos que são consumidos *in natura*, ou que são processados e transformados em sucos, licores, mousses, bombons e sorvetes (BÜTTOW et al., 2009; FONSECA, 2012). Até o presente momento, relatos acerca do uso de espécies de *B. odorata* ou de *B. capitata* como substratos na produção de lipases ou de outras enzimas microbianas são inexistentes. Nesse sentido, a produção de lipases empregando-se a casca de butiá é particularmente interessante, visto que sua utilização racional de espécies nativas por meio de seu manejo sustentável pode contribuir para a preservação dessa espécie, além de poder gerar renda para os pequenos agricultores (NAZARENO, 2013).

Dentro da família Aracaceae, destaca-se o gênero *Elaeis* pelo uso do óleo de dendê, ou óleo de palma, bem como os resíduos de seu processamento na produção de lipases por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotricum* e *Fusarium* (FEITOSA et al., 2010; SHIN et al., 2010; YOO et al., 2011; NWUCHE; OGBONNA, 2011; TALUKDER et al., 2013). Segundo Ramos et al. (2011), o óleo de palma apresenta como seu principal constituinte o ácido palmítico, justificando-se, desta

forma, a alta atividade de lipásica verificada nesse substrato. Ainda, outros resíduos agroindustriais ou substratos puros são utilizados na produção de lipases fúngicas. Fleuri e colaboradores (2014) avaliaram a produção de lipases por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* empregando-se diferentes combinações de farelo de trigo, farelo de soja e bagaço de cana. Esses autores obtiveram maiores níveis de atividade quando *Aspergillus sp.* foi crescido em farelo de soja e bagaço de cana, apresentando uma atividade correspondente a 11,1 U/mL. Já Quadros et al., (2009), ao utilizarem água de maceração de milho suplementada com óleo de cozinha usado, atingiu níveis de produção de lipases por uma outra linhagem de *F. oxysporum* correspondentes a 15 U/mL. Almeida et al. (2013), ao avaliarem a produção de lipases pela levedura *Candida viswanathii*, determinaram que 58,5 U/h foram obtidas quando o azeite de oliva foi empregado como substrato. Rifaat e colaboradores (2010) obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo em relação a produção de lipases por uma outra linhagem de *F. oxysporum* (16 U/mL), em fermentação submersa. Maldonado e colaboradores (2014) reportaram o crescimento de *F. oxysporum* em meio líquido contendo óleo de soja como indutor de lipases. Nesse estudo, dentre todos os outros fungos pesquisados, esta espécie foi quem apresentou menor potencial lipolítico, com uma produção correspondente a 3,38 U/mL.

Caracterização da casca de butiá por infravermelho

Os picos característicos das funções orgânicas presentes no casca de butiá podem ser visualizados na Figura 1. Os principais picos e bandas observadas nestas amostras foram dispostos na Tabela 2, em que é possível visualizar os grupos funcionais e suas respectivas faixas espectrais. A identificação destes grupos funcionais em função de seus números de onda foi baseada no trabalho de Lopes e Fascio (2004). Os números de onda referentes aos picos dos grupos funcionais dos compostos orgânicos presentes em amostras de casca de *B. odorata* são característicos de biomoléculas como: proteínas, carboidratos, triglicerídeos e outros. Os grupos funcionais álcoois e amidas são referentes aos aminoácidos presentes nas proteínas. Álcool e outros grupos funcionais como éter estão presentes nos carboidratos. As carbonilas de éster são os grupos funcionais que estão presentes nos triglicerídeos constituintes da casca de *B. odorata*. Evidencia-se, portanto, a quantidade expressiva de grupos ésteres presentes na casca de butiá, justificado assim, a indução das lipases produzidas pelo fungo *F.*

oxysporum. As interpretações de outros picos menos expressivos no espectrograma é muita complexa e, por esta razão, estes não foram analisados.

Otimização da produção de lipases empregando-se a casca de butiá como substrato

No presente estudo, a MSR foi utilizada como ferramenta matemática e estatística para o estabelecimento das condições ótimas para produção de lipases pelo fungo *F. oxysporum*. Por meio do emprego do delineamento composto central (DCC) 2³, as interações entre os fatores concentração do substrato(S), tempo de cultivo(T) e pH do meio de cultivo(pH) foram avaliadas.

A linhagem de *F.oxysporum* foi cultivada em fermentação submersa utilizando casca de butiá como substrato, em virtude dos elevados níveis de lipases obtidos por meio da utilização desse substrato. Os valores reais e codificados, bem como os resultados obtidos no planejamento experimental estão apresentados na Tabela 3, onde os tratamentos de 1 a 18 fazem parte do delineamento experimental, enquanto a corrida 19 refere-se à validação interna do modelo.

A atividade lipásica foi expressa pela equação 2, levando-se em consideração apenas os termos significativos, onde os dados foram analisados por regressão linear múltipla:

$$\text{Atividade lipásica(Farelo casca de Butiá): } 22,20 + 2,85S - 2,30pH - 4,64pH^2 - 4,36t^2 - 7,64SpH + 2,29pHt \quad (2)$$

Onde S, é a concentração do substrato; pH do meio de cultivo; e t é o tempo de cultivo. Por meio da Tabela 3, constata-se que o modelo para a atividade lipásica foi significativo ($p < 0,05$). Considerando-se o teste *F*, o modelo foi preditivo, sendo que o valor de *F* calculado foi maior que o *F* tabelado. O coeficiente de determinação R² de 0,7768 demonstrado na Tabela 3 indica que 77,68% da variabilidade dos dados pode ser explicada pelo modelo utilizado. Considerando-se experimentações biológicas, o coeficiente de determinação R² demonstrou ser um ótimo valor.

Na tabela 3, os coeficientes de regressão também podem ser observados, onde o *p-valor* indica a significância dos coeficientes. Nota-se que os termos lineares das variáveis independentes pH e concentração do casca de butiá(S) foram significativos, enquanto que a variável tempo demonstrou não ser significativa pois o seu *p*valor ficou

acima do esperado (p valor $<0,5$). Para os termos quadráticos, a concentração da casca de butiá(S) não demonstrou ser significativa, enquanto que para os termos pH e tempo os valores foram significativos, demonstrando a influência destes fatores na produção de lipases.

Dessa forma, verifica-se que em relação à produção de lipases pelo fungo *F. oxysporum*, a variável mais importante foi a interação entre a concentração da casca de butiá(S) com o pH de cultivo (pH), seguida pelo pH quadrático (pH²). Baseando-se no modelo experimental destacado e como evidenciado na Figura 2, as condições estabelecidas como ótimas para a produção de lipases fungo *F. oxysporum* foram concentração da casca de butiá 2,9%, pH de cultivo 4,2 e tempo de cultivo de 4,4 dias (corrida 5).

Os níveis de produção de lipases obtidas no presente estudo (35,82 U/mL) são superiores àqueles obtidos por Papagora et al., (2013). Nesse estudo, o fungo *Debayomeces hansenii* foi cultivado em meio líquido por 72 h, a 30°C, em condições pré-estabelecidas. Para o delineamento central composto foram avaliados 3 fatores: concentração de glicose, concentração de azeite de oliva e pH do meio de cultivo. Como resultado, a concentração da glicose e do azeite de oliva foram mais significativos em relação à produção da referida enzima. Após a otimização por meio do emprego do DCC, os níveis de lipases alcançados foram 10,12 U/mL.

O fungo filamentosso *Fusarium solani*, isolado de efluentes de laticínios da Índia por Kammani et al. (2013), foi avaliado quanto a produção de lipases, empregando-se a MSR. Esses autores verificaram que a produção de lipases atingiu níveis máximos correspondentes a 73,3 U/mL, ao empregar 1% de azeite de oliva como substrato, suplementado com 5,5 g/L de sulfato de amônio e 0,1 g/L de carbonato de cálcio. Nos estudos de Oliveira et al. (2014), a atividade lipásica do fungo *Fusarium* sp. foi também otimizada. Por meio da determinação dos melhores constituintes do meio de cultivo, a saber, concentração de gordura de frango (15.0 mL/L), sulfato de amônia (4.5 g/L) e Triton X-100 (15.0 g/L), um aumento na atividade de 87,27% foi verificado.

A validação interna do modelo para otimização das lipases produzidas por *F. oxysporum* foi realizada. As condições relatadas acima na corrida 5 foram repetidas em triplicata e os índices de atividade lipásica foram utilizados para a modelagem a partir das equações quadráticas geradas pela MSR. Na validação do modelo, atingiu-se uma média de atividade de 33,29 U/mL, enquanto que o obtido inicialmente pelo modelo correspondeu a 28,27 U/mL. Desta forma, uma recuperação equivalente a 117,74% foi

atingida. Essa alta recuperação demonstra a adequação do modelo gerado, indicando que esse tipo de modelagem matemática pode ser aplicado como forma de otimizar a produção de enzimas microbianas, de uma maneira geral.

Caracterização bioquímica das lipases produzidas por *F. oxysporum*

Determinação do pH e da temperatura ótimos de atuação e estabilidade frente à temperatura e a diferentes valores de pH

A caracterização de lipases produzidas por microrganismos é uma etapa crucial, uma vez que podem determinar o segmento industrial em que a enzima estudada poderá ser aplicada (HASAN et al., 2009; LI e ZHONG et al., 2010).

Por esta razão, a temperatura ótima de atuação das lipases produzidas por *F. oxysporum* foi estabelecida. Por meio da Figura 3 A-B, verifica-se que as lipases apresentaram atividade ótima a 45-50 °C. Em relação à termoestabilidade, as lipases de *F. oxysporum* foram bastante estáveis a 45 °C, apresentando uma meia vida ($T_{1/2}$) em torno de 75 minutos. Relativa estabilidade também foi verificada a 50°C, onde a meia vida em torno de 40 minutos foi observada. Entretanto, estas enzimas apresentaram uma baixa estabilidade a 55°C ($T_{1/2}$ de 17 min).

Semelhantemente a este estudo, as lipases produzidas por *Trichosporon coremiiforme* apresentaram atividade ótima a 50°C, mantendo-se estáveis de 30 a 50°C (LAACHARI et al., 2013). Resultados semelhantes também foram obtidos por Ülker e colaboradores (2011), ao estudarem as lipases produzidas por *Trichoderma harzianum*, as quais apresentaram atividade ótima a 40°C e estabilidade entre 20 e 40°C. Em contrapartida, lipases que exibem atividade ótima e estabilidade em temperaturas extremas, oriundas de microrganismos psicrófilos ou termófilos, têm sido reportadas (FUCIÑOS et al., 2005; MHETRAS et al., 2009). A levedura *Candida antarctica* produziu duas isoformas da enzima (A e B), as quais se mantiveram estáveis a 60°C (YAO et al. 2011; DIMITRIJEVIC et. al., 2012). Lipases ativas em temperaturas baixas foram relatadas por Cai e colaboradores (2009), produzidas pelo fungo *Geotrichum* sp. SYBCWU-3. Neste estudo, as isoformas LipA e LipB apresentaram como temperaturas ótimas de atuação 20 °C e 15 °C, respectivamente, permanecendo estáveis a 20°C.

O efeito do pH sobre a atividade das lipases produzidas por *F. oxysporum* foi

avaliado na faixa de pH 3,0-9,0, em intervalos de 0,5 unidades (Figura 4 A-B). Uma maior atividade foi detectada em pH 7,5, sendo estas enzimas estáveis na faixa de pH entre 5,5-7,5, onde aproximadamente 80% de sua atividade inicial foi verificada.

Nos estudos de Santos et al. (2012), as lipases provenientes de uma outra linhagem de *F. oxysporum* apresentaram atividade ótima em pH 8,5 e foram estáveis em pH 6,5. Já as lipases produzidas por *Penicillium* sp. e *Geotrichum* sp. apresentaram estabilidade na faixa de pH 5,5-7,5 (CARVALHO et al., 2005). Contrariamente a estes resultados, as lipases produzidas por *Aspergillus niger* exibiram sua atividade ótima em pH 6,0, bem como foram mais estáveis neste valor de pH (FALONY et al., 2006). Ainda, a levedura *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639 se mostrou estável e exibiu atividade ótima em pH ácido 5,5 (SATHISH YADAV et al., 2011).

Efeito de íons e de outras substâncias sobre a atividade das lipases de F. oxysporum

Dados na literatura evidenciam que algumas lipases são dependentes de alguns íons metálicos ou de outras substâncias ativadoras. A estabilidade destas enzimas frente a estas substâncias é frequentemente averiguada, uma vez que as mesmas podem estar presentes em determinados processos industriais. Normalmente, diferentes concentrações são utilizadas, visto que a interação entre o sítio catalítico da enzima com seu respectivo substrato pode aumentar a formação do produto da hidrólise, ou mesmo diminuir. Outras substâncias como solventes e surfactantes também são comumente avaliados nesse sentido (HASAN et al., 2010; SHARMA et al., 2001; SHARMA; KANWAR, 2014; TREICHEL et al., 2009). Quando as lipases são estáveis em diferentes substâncias, existe a possibilidade de sua aplicação em diferentes segmentos industriais, como nas reações de transesterificação, na síntese de ésteres e na resolução de racêmicos (GUPTA et al., 2007; 2009).

Ao avaliar a Figura 5, nota-se que as lipases de *F. oxysporum* apresentaram uma ativação mais pronunciada em presença de β -mercaptoetanol a 10 mM, correspondendo a 623,58%, seguida pelo íon Ca^{+2} a 10 mM, apresentando um aumento de 260,98% em relação a sua atividade inicial. Similarmente ao presente estudo, a lipase produzida pelo fungo *Bulkhoidera* sp. HY-10 foi 122% ativada em presença de β -mercaptoetanol, quando empregado em uma concentração de 1 mM (PARK et al., 2007). Em contrapartida, Ugur et al., (2014) observaram apenas uma discreta ativação do β -mercaptoetanol (108%) sobre as lipases produzidas por *Streptomyces* sp.

Contrariamente, o β -mercaptoetanol a 2 mM atuou como inibidor das lipases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* SRT9, onde cerca de 87% de sua atividade inicial foi verificada (BORKAR et al., 2009).

A ativação por β -mercaptoetanol observada no presente estudo pode ser justificada pela prevenção da oxidação dos grupos sulfidríla promovida por esta substância (NAWANI et al., 2006; BEITEL e KNOB, 2012), a qual permite sugerir que resíduos de cisteína estejam presentes no sítio ativo das lipases de *F. oxysporum*.

Ülker e colaboradores (2011) verificaram uma ativação de 25% das lipases produzidas por *T. harzianum* IDM14D em presença dos íons Ca^{+2} , a 1 mM. Similarmente, nos estudos de Yu e colaboradores (2009) os íons Ca^{+2} foram capazes de ativar 24%as lipases produzidas por *Rhizopus chinensis*. A ativação da lipase de *F. oxysporum* pelo Ca^{+2} pode ser explicada pela estabilização desses íons na estrutura da enzima. Ainda, sugere-se novamente a importância dos resíduos de cisteína para a função catalítica desta enzima, uma vez que os íons Ca^{+2} normalmente conferem uma proteção dos grupos tiol (ALMEIDA et al., 2013).

Por meio da figura 5, observa-se ainda que as enzimas de *F. oxysporum* foram inibidas pelo EDTA, Mg^{+2} e Cu^{+2} . Ao avaliar a estabilidade de lipases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* SRT9, Borkar et al. (2009) constataram que o EDTA empregado a uma concentração de 5 mM foi capaz de inibir fortemente as enzimas produzidas, observando-se uma atividade residual de 35%. Similarmente, nos estudos de Enujiugha (2009), as lipases produzidas por *Tetracarpidium conophorum* também foram inibidas pelo EDTA. A partir da inibição por EDTA verificada, sugere-se que cofatores são necessários para a atividade da enzima. Adicionalmente, verifica-se que as enzimas de *F. oxysporum* foram inibidas pelo citrato de sódio. Contrariamente, o citrato de sódio foi capaz de ativar as β -xilosidases produzidas *Penicillium sclerotiorum* (KNOB et al, 2011). O citrato de sódio é um composto quelante, o qual tem a capacidade de "aprisionar" alguns íons divalentes como Mn^{+2} , Mg^{+2} e Ca^{+2} essenciais para a atividade catalítica da enzima. Quando o citrato de sódio "quela" um íon que exerce a função de cofator da enzima, ocorre a diminuição da afinidade do substrato pela enzima, reduzindo, portanto, sua atividade. Especificamente neste caso, o citrato deve estar atuando sobre o Ca^{2+} , o qual foi estabelecido como cofator das lipases de *F. oxysporum*.

Efeito de surfactantes sobre as lipases de F. oxysporum

O efeito de diferentes surfactantes sobre a atividade lipásica está apresentado na Figura 5B. O agente catiônico CTAB foi capaz de ativar a atividade enzimática na concentração de 0,1%. Entretanto, quando empregado em maiores concentrações, um efeito inibidor sobre a atividade enzimática foi constatado. Nos estudos de Salameh e Wiegel (2010), as lipases alcalinas produzidas por *Thermosyntropha lipolytica* foram inibidas por CTAB nas concentrações de 2-10 mM, exibindo atividades inferiores a 15% em relação sua atividade inicial. No entanto, outros estudos demonstram que o CTAB é capaz de promover a ativação de lipases. De acordo com Alfani et al. (2000), o efeito ativador pode ser explicado pela mudança conformacional que este agente promove na enzima, chamado de "micelas reversas", o qual é responsável pelo aumento na afinidade da enzima pelo substrato.

As lipases de *F. oxysporum* também foram ativadas pelo surfactante aniônico SDS a 0,5%, o qual promoveu um aumento de 215,81% em sua atividade inicial. Resultados similares foram obtidos por Silva et al. (2005) e por Salameh et al. (2010), em que o agente SDS foi capaz de ativar as lipases produzidas *Metarhizium anisopliae* e *T. lipolytica*, respectivamente. Essa ativação pode ser explicada pela ligação do SDS aos componentes do sítio ativo, promovendo, desta forma, a exposição desta região ao substrato. Ainda, o efeito ativador promovido pelo SDS evidencia que as interações hidrofóbicas não determinam a mudança conformacional da enzima (SALAMEH et al., 2010). Em contrapartida, a maioria dos estudos demonstra a inibição de lipases microbianas pelo agente SDS (MATEOS DIAZ et al., 2006; XIA et al., 2011; ALMEIDA et al., 2013).

A inibição da atividade lipásica de *F. oxysporum* foi promovida pelos agentes Tween 20 e Tween 80, onde apenas cerca de 60% de sua atividade inicial foi observada. Similarmente, as lipases produzidas por *F. oxysporum* foram inibidas pelo Tween 40 e 80, nos estudos conduzidos por Prazeres et al. (2006). Nesse caso, o melhor ativador da enzima foi o Triton x-114. Contrariamente, nos estudos de Liu et al. (2009), as lipases de *F. solani* apresentam uma ótima estabilidade frente a esses mesmos compostos.

Os surfactantes apresentam a capacidade de reduzir a superfície e a tensão superficial dos fluídos que não apresentam afinidade com a água. Este fato os torna capazes de aumentar a solubilidade, mobilidade, disponibilidade, e subsequente degradação de compostos orgânicos hidrofóbicos ou insolúveis (SINGH et al., 2006). A excelente estabilidade apresentada pelas lipases de *F. oxysporum* frente ao detergente SDS sugere o potencial de aplicação dessas enzimas em indústrias de detergentes.

Estabilidade das lipases de F. oxysporum frente a diferentes solventes

A atividade lipásica é fortemente influenciada pela polaridade dos solventes orgânicos, os quais podem conduzir ou não à desnaturação da proteína. Dentre os solventes avaliados, evidencia-se a estabilidade das lipases de *F. oxysporum* frente ao hexano na concentração de 20% (Tabela 4), o qual foi capaz de promover uma ativação correspondente a 129%. Resultados semelhantes foram obtidos por Coradi et al., (2012), ao avaliarem o efeito do hexano sobre as lipases provenientes de uma outra linhagem de *F. oxysporum*. Neste estudo, as enzimas mantiveram-se estáveis em n-hexano na concentração 100%. Já Maia et al. (1999) observaram um aumento considerável na atividade lipásica de *F. solani* FS1 em hexano 40%, correspondente a 170%. Outros trabalhos na literatura também reportam o n-hexano como ativador de lipases (ADNANI et al., 2010; SÁNCHEZ-OTERO et al., 2010; RAMOS et al., 2011). A ativação de lipases pelo hexano é discutida por Rapp e colaboradores (1995) e tem sido explicada pela propriedade de emulsificação que esse solvente apolar apresenta. Por se tratar de um composto imiscível em água, ele promove um melhor contato entre a enzima e o substrato.

Ainda, por meio da Tabela 4, verifica-se que as lipases de *F. oxysporum* foram inibidas em presença de metanol a 80%, exibindo apenas 22,53% de sua atividade inicial em presença deste composto. Essa inibição deve-se ao fato de que, por ser um solvente polar, o metanol é capaz de remover a água de solvatação da estrutura enzimática, promovendo uma desestabilização da enzima, a qual resulta na diminuição de sua atividade (NAWANI et al., 1998; CASTRO-OCHOA et al., 2005; GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011). Similarmente, ao avaliar a estabilidade de lipases produzidas por *Burkholderia glumae* frente a diversas substâncias, Santambrogio e colaboradores (2013) verificaram que a atividade enzimática foi diminuída em presença de metanol nas concentrações de 50-70%. Contrariamente a esses resultados, Almeida e colaboradores (2013) constataram que o metanol nas concentrações de 1% e 10% não influencia a atividade lipásica de *C. viswanathii*.

Atividade de transesterificação

A principal função das lipases é sua capacidade de hidrolisar triacilgliceróis de cadeia longa. Porém duas outras funções também são destacadas, a de esterificação e transesterificação. Vários processos industriais utilizam essa capacidade para a síntese de ácidos graxos livres, que são usados em diferentes compostos. Na presente pesquisa, a capacidade de transesterificação pela lipase produzida por *F. oxysporum* foi avaliada (Figura 6).

Nota-se que a atividade de esterificação das lipases de *F. oxysporum* foi observada sobre todos os óleos avaliados. Entretanto, maiores níveis de atividade lipásica foram obtidos quando o óleo de andiroba foi empregado como substrato, correspondendo a 26,88 U/mL. Esse resultado pode ser explicado muito provavelmente devido a sua constituição do óleo de andiroba, o qual, segundo Teixeira (2012), é composto por 48,19% de ácido oléico; 28,81% de ácido palmítico; 10,59% de ácido oléico; 8,93% de ácido esteárico e outros 3,48% respectivamente. Até o presente momento, o uso de óleo de andiroba em processos de transesterificação ou esterificação via enzimática não foi descrito na literatura. Porém, a viabilidade de seu uso para a produção de ésteres etílicos e metílicos a fim de serem empregados na obtenção de biodiesel por hidrólise química foi reportada em alguns estudos previamente realizados (TEIXEIRA, 2012; SILVA, 2005).

Normalmente, a atividade de esterificação por lipases fúngicas tem sido evidenciada sobre outros substratos, como o óleo de palma (SHRIMAN et al, 2010) e óleo de soja (OLIVEIRA et al., 2014). A avaliação da capacidade de esterificação é um dado importante na caracterização das lipases microbianas. Essa característica permite que as enzimas sejam empregadas em diversos setores industriais, incluindo sua aplicação na indústria alimentícia (SHARMA et al., 2001; KIM et al., 2006; LARIOS et al., 2004; CARVALHO et. al., 2005); de química fina; na produção de biodiesel, entre outras (BAJAJ et al., 2010; MESSIAS et al., 2011).

Conclusões

No presente estudo, elevados níveis de lipases foram produzidos por *F. oxysporum* quando cultivado em casca de butiá, uma fonte de carbono alternativa, até então não relatada na literatura na produção de enzimas microbianas. As lipases de *F. oxysporum* apresentam propriedades bioquímicas interessantes, como estabilidade em pH neutro/alcalino e termoestabilidade a 45°C. Ainda, foram estáveis em presença de

diferentes substâncias como íons, surfactantes e solventes orgânicos, sugerindo a viabilidade de sua aplicação na indústria de detergentes. O modelo experimental demonstrou ser uma ferramenta essencial, a fim de estabelecer as melhores condições de cultivo fúngico para a produção enzimática. Adicionalmente, a atividade de esterificação das lipases de *F. oxysporum* sobre o óleo de andiroba sugere a aplicabilidade destas enzimas no processo de obtenção de biodiesel, a partir deste substrato.

Referências

ABADA, E. A. E. Production and characterization of a mesophilic lipase isolated from *Bacillus stearothermophilus* AB-1. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.11, p. 1100-1106, 2008.

ADNANI, A. et al. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of xylitol ester by taguchi robust design method. **Industrial Crops and Products, Elsevier**. v. 31, n. 2, p. 350-356, jan. 2010.

ALFANI, F. et al. α - Chymotrypsin Superactivity in Cetyltrialkylammonium Bromide-Rich Media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 88, p. 1-15, jul-set 2000.

ALMEIDA, A. F. D.; TAULK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1225-1234, 21 dez. 2012.

ALMEIDA, A. F. de; TAUK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid lipase from *Candida viswanathii*: production, biochemical properties, and potential application. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 435818, jan. 2013.

ALVES, M.H.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; PORTO, A.L.F.; MILANEZ, A.I. Screenig of *Mucor* spp. for production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, 2002.

BADENES, S.M.; LEMOS, F.; CABRAL, J.M.S. Transesterification of oil mixtures catalyzed by microencapsulated cutinase in reversed micelles. **Biotechnology Letters**. v.32, p. 399-403, mar. 2010.

BAJAJ A. et al .Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 62, p. 9-14, 2010.

BEITEL, S. M.; KNOB, A. *Penicillium miczynskii* β -glucosidase: A Glucose-Tolerant

Enzyme Produced Using Pineapple Peel as Substrate. **Industrial Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 293-300, out. 2012.

BORKAR, P. S. et al. Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 358-66, jun. 2009.

BÜTTOW, M. V. et al. Conhecimento tradicional associado ao uso de butiás (*Butia* spp., arecaceae) no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 31, n. 4, p. 1069-1075, dez. 2009.

CAI, Y. et al. Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBC WU-3. **Process Biochemistry**. v. 44, p. 786-790, fev. 2009.

CASTRO-OCHOA, L. D.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R. O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 648–654, 2005.

CAMARGO-DE-MORAIS, M.M; RAMOS, S.A.F.; PIMENTEL, M.C.B.; MORAIS Jr., M.A.; LIMA FILHO, J.L. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 191-194, 2003.

CARVALHO, P. D. O. et al. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614–621, ago. 2005.

COLLA, L. M; REINEHR, C. O; COSTA, J. A. V. Applications And Production Of Microbial Lipases . **Revista CIATEC – UPE**, v.4, n. 2, p.1-14, 2012.

CORADI, G. V. et al. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de lipases por fungos filamentosos. In: XXI Congresso de Iniciação Científica (Unesp), 2009, São José do Rio Preto. **Anais... XXI Congresso de Iniciação Científica (Unesp)**, 2009.

DIMITRIJEVIC, A.; VELICKOVIC, D.; BIHELOVIC, F.; BEZBRADICA, D.; JANKOV, R.; MILOSAVIC, N. One-step, inexpensive high yield strategy for *Candida antarctica* lipase A isolation using hydroxyapatite. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 358-362, 2012.

ENUJIUGHA, V. N. Isolation and preliminary characterization of conophor nut (*Tetracarpidium conophorum*) lipase. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, n. February, p. 9-12, 2009.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. de(Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2004.

FALONY, G. et al. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. **Original Scientific Paper**, v. 44, n. 2, p. 235–240, 2006.

FEITOSA, I. C. et al. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. **Acta Scientiarum. Technology**. v. 32, n. 1, p. 27-31, 1 jan. 2010.

FLEURI, L. F. et al. Production of fungal lipases using wheat bran and soybean bran and incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. **Food Science and Biotechnology**. v. 23, n. 4, p. 1199-1205, ago. 2014.

FONSECA, L. X. **Caracterização de frutos de butiazeiro (*Butia odorata* Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi e estabilidade de seus compostos bioativos na elaboração e armazenamento de geleias**. Dissertação(Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindústria - nível Mestrado) Universidade Federal de Pelotas, 2012.

FUCIÑOS, P.; ABADÍN, C. M.; SANROMÁN, A.; LONGOB, M. A.; PASTRANA, L.; RÚA, M. L. Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 117, p. 233-241, 2005.

GUPTA R.; GUPTA N.; RATHI P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.64, p.763-781. 2004.

GUPTA R.; RATHI P. BRADDOO S. Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 635-644, 2003.

GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 1–21, 2011.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 6, p. 782–98, 2009.

HASAN, F. et al. Enzymes used in detergents: Lipases. **African Journal of Biotechnology**. v. 9, n. 31, p. 4836-4844, Ago. 2010.

HOSHINO, T. ET AL. PURIFICATION and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f sp. lini. BioSc., **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v. 56, p. 660-664.1992

KAKDE, R. B. Extracellular Lipase Enzyme Production by Seed-Borne Fungi under the Influence of Physical Factors. **International Journal of Biology**, v. 3, n. 1, p. 94–100, 2011.

KANMANI, P. et al. The Use of Response Surface Methodology as a Statistical Tool for Media Optimization in Lipase Production from the Dairy Effluent Isolate *Fusarium solani*. **ISRN Biotechnology**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

KIM, H.; YOUN, S.; SHIN, C. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol–fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. **Journal of biotechnology**, v. 123, n. 2, p. 174–184, 2006.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Purification and properties of an acid β -xylosidase from *Penicillium sclerotiorum*. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 501–508, 23 maio 2011.

LAACHARI, F. et al. Biochemical characterization of a thermoactive and thermostable lipase from a newly isolated *Trichosporon coremiiforme* strain. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 28, p. 4503–4511, 2013.

LARIOS, A.; GARCIA, H.S.; OLIART, R.M.; VALERIO-ALFARO, G. Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 373-376, 2004.

LI, N.; ZONG, M.H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal Molecular Catalyses B: Enzymes**, v. 66, p. 43– 54, 2010.

LIU, R.; et al. A novel low-temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain *Fusarium solani* N4-2 for detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 3, p. 265–270, nov. 2009.

MAIA, M. DE M. D. et al. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Revista de Microbiologia**. v. 30, n. 4, p. 304-309, dez. 1999.

MALDONADO, R. R. et al. Lipase Production Using Microorganisms from Different Agro-Industrial By- Products. **International Journal of Applied Science and Technology**. v. 4, n. 1, p. 108–115, jan. 2014.

MANESSE, M.L.M.; COX, R.C.; KOOPS, B.C.; VERHEIJ H.U.; HAAS, G.H. EGMOND, M.R.; VAN DER HIJDEN H.T.W.M.; VLIEGS, J. Cutinase from *Fusarium solani* pisi hydrolyzing triglyceride analogues. Effect of acyl chain length and position in the substrate molecule on activity and enantioselectivity. **Biochemistry**, v.34, p. 6400-6407, 1995.

MATEOS DIAZ, J. C. et al. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1042–1050, set. 2006.

MAURMANN, K. Como o manejo tradicional da folha de *Butia capitata* (Martius Beccari) pode promover a conservação dos buiazaís? 2013. Trabalho de conclusão de curso (Instituto de biociências UFRGS) Porto Alegre.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO J. R. A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídios. **Química Nova**, v. 28, p. 296-305, 2005.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213–234, 30 set. 2011.

MHETRAS, N.C.; BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1486-1490, 2009.

NAZARENO, A. G. Conservação de *Butia eriospatha* (Martius ex Drude) Beccari (Arecaceae): Uma espécie de flora brasileira ameaçada de extinção. 2013. Tese (Programa de Pós Graduação em recursos genéticos vegetais da UFSC). Florianópolis 2013.

NAWANI, N.; DOSANJH, N.S.; KAUR, J. A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 997-1000, 1998.

NAWANI, N.; DOSANJH, N. S.; KAUR, J. A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: Purification and characterization. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 290, p.17–22, 2006.

NC-IUBMB (Ed.). Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB): Enzyme Nomenclature. Recommendations. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/cont3aa.html>>. Acesso em: 29 set. 2014

NWUCHE, C. O.; OGBONNA, J. C. Isolation of Lipase Producing Fungi from Palm Oil Mill Effluent (POME) Dump Sites at Nsukka. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. February, p. 113–116, 2011.

OLIVEIRA, B. H. et al. Comparison of lipase production on crambe oil and meal by *Fusarium* sp. (*Gibberella fujikuroi* complex). **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, n. 12, p. 1413–1425, 22 dez. 2013.

OLIVEIRA, B. H.; VALRIA, M. G. L. Chicken fat and inorganic nitrogen source for lipase production by *Fusarium* sp. (*Gibberella fujikuroi* complex). **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 12, p. 1393–1401, mar. 2014.

PABLINE, R. M. B. et al. Selection and optimization of extracellular lipase production using agro-industrial waste. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 566–573, 22 jan. 2014.

PANAGIOTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v.18, p. 37-45, 2003.

PAPAGORA, C.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 413-420, out. 2013.

PARK, D.-S. et al. Characterization of an extracellular lipase in *Burkholderia* sp. HY-10 isolated from a longicorn beetle. **Journal of microbiology**. v. 45, n. 5, p. 409-17, out.

2007.

PAQUES F. W, MACEDO G. A. Lipases of plants latex: properties and industrial applications. **Química Nova**, v. 29, p. 93-99, 2006.

PRAZERES, J. N. ; CRUZ, J. A. B.; PASTORE, G. M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 505-509, 2006.

QUADROS, C.P.; BICAS, J.L.; NERI-NUMA, I.A.; PASTORE, G.M. Producing alkaline lipase by *Fusarium oxysporum* using unconventional medium components. **Food Science and Biotechnology**, v. 18, n. 6, 4 p., 2009.

RAMOS, L. P. et al. Tecnologias de Produção de Biodiesel. **Rev. Virtual Química**, v. 3, n. 5, p. 385–405, out. 2011.

RIFAAT, H. M.; et al. Production , optimization and partial purification of lipase from *Fusarium oxysporum*. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**, v. 5, n. 1, p. 39–53, Fev. 2010.

RAPP, P. et al. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.17, p.832-838. (1995).

SALAMEH, M. A; WIEGEL, J. Effects of Detergents on Activity, Thermostability and Aggregation of Two Alkalithermophilic Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. **The Open Biochemistry Journal**, v. 4, p. 22–8, jan. 2010.

SANTAMBROGIO, C., et al. Effects of methanol on a methanol-tolerant bacterial lipase. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 97. p. 8609-8618, 2013.

SANTOS, R. C. A. et al. Evaluation of temperature and moisture response surface on

the lipase from pumpkin seeds fermentation using *Aspergillus niger*. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 34, n. 3, p. 255–260, maio 2012.

SÁNCHEZ-OTERO, M.; et al. Enzymatic reactions and synthesis of n-butyl caproate: esterification, transesterification and aminolysis using a recombinant lipase from *geobacillus thermoleovorans* ccr11. **Environmental Technology**, v. 31, n. 10, p. 1101–1106, 2010.

SATHISH YADAV, K. N.; ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; JADHAV, D. D.; THULASIRAM, H. V.; GOKHALE, G. V. Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10663–10670, 2011.

SEDMAK, J. J.; GROSSBERG S. E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**, v.79, n.1-2, p. 544-552, 1977.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; CHAND, U. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**. Índia, v. 19, p. 627–662, 2001.

SINGH, A., KUMAR P. K. R.; SCHUEGERL, K. D. Xylose fermentation and catabolism in *Fusarium oxysporum*. **Biochemistry International**, v. 27: 831-839. 1992.

SINGH, A., SCHUEGERL, K. Induction and regulation of D-xylose catabolizing enzymes in *Fusarium oxysporum*. **Biochemistry International**, v.28: 481-488. 1992.

SINGH, R. et al. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 70, n. 6, p. 679–82, maio 2006.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; CHAND, U. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**. v. 19, p. 627–662, 2001.

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic solvent tolerant lipases and applications. **TheScientific World Journal**, v. 2014, p. 625258, jan. 2014.

SINGH A. K., MUKHOPADHYAY M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 166, p. 486-520, 2012.

SHIM, J.-A.; AKOH, C. C.; LEE, K-T. Enzymatic interesterification of anhydrous butterfat with flaxseed oil and palm stearin to produce low-trans spreadable fat. **Food Chemistry**, v. 120, p. 1-9, 2010.

SILVA, Cleber Luiz Maia da. **Obtenção de ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol**. 2005. p. 78. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, São Paulo, 2005.

SRIMHAN, P. et al. Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 3, p. 293–8, 7 mar. 2011.

SUN, S.; LI, P.; LIU, B.; LIU, D.; LI, Z. Solid state fermentation of rice chaff for fibrinolytic enzyme production by *Fusarium oxysporum*. **Biotechnology Letters**, v.19, n.5, p. 465-467, 1997.

SUN, S.; LIU, B.; LI, P.; LIU, D.; LI, Z. New solid-state fermentation process for repeated batch production of fibrinolytic enzyme by *Fusarium oxysporum*. **Process Biochemistry**, v. 33, n.4, p. 419-422, 1998.

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbial Genetics Bull.**, v. 13, p. 42-43, 1956.

TALUKDER, M. M. R. et al. Potential use of whole cell lipase from a newly isolated *Aspergillus nomius* for methanolysis of palm oil to biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 108–113, maio 2013.

TEIXEIRA, Evilácio Luz. **Produção de Biodiesel através da hidroesterificação do óleo de andiroba (*Carapa guianensis-Aubl*) via catálise heterogênea ácida**. 2011.

p.88. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Engenharia Química)-Universidade Federal do Pará, Instituto de tecnologia, Belém, Pará, 2012.

TREICHEL, H. et al. A Review on Microbial Lipases Production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182–196, 25 mar. 2009.

UGUR et al. New Lipase for Biodiesel Production: Partial Purification and Characterization of LipSB 25-4. **ISRN Biochemistry** . vol 2014, p. 1-7, 2014.

ÜLKER, S. et al. Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, p. 543–550, 2011.

XIA, J.; HUANG, B.; NIE, Z.; WANG, W. Production and characterization of alkaline extracellular lipase from newly isolated strain *Aspergillus awamori* HB-03. **Journal Central South University of Technology**, v. 18, p. 1425?1433, 2011.

YANG, J.-Y. et al. Expression of an uncleavable N-terminal RasGAP fragment in insulin-secreting cells increases their resistance toward apoptotic stimuli without affecting their glucose-induced insulin secretion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 38, p. 32835–42, 23 set. 2005.

YANG, J.; KOGA, Y.; NAKANO, H.; YAMANE, T. Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through in vitro combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site. **Protein Engineering**, v. 15, p. 147-152, 2002.

YAO, H.; ZHANGA, T.; XUE, H.; TANGA, K.; LI, R. Biomimetic affinity purification of *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Chromatography B, Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 3896– 3900, 2011.

YOO, H-Y.; SIMKHADA, J. R.; CHO, S. S.; PARK, D. H.; KIM, S. W.; SEONG, C. N.; YOO, J. C. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6104-6111, 2011.

YU, H.; HAN, J.; LI, N.; QIE, X.; JIA, Y. Fermentation performance and characterization of cold-adapted lipase produced with *Pseudomonas* Lip35. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, no. 8, p. 956-962, 2009.

Tabelas e Figuras

Tabela 1– Avaliação da influência de diferentes substratos a 1% sobre a produção de lipases e sobre o crescimento de *F. oxysporum*.

Substrato	U/mL	Proteína Intracelular (mg/mL)	Atividade específica
Butiá	17,45±0,001	0,073±0,002	810,66±44,09
Azeite de oliva	12,16±0,001	0,132±0,001	872,5±35,57
Soro de queijo	10,63±0,004	0,034±0,003	4831,8±132,5
Borra de café	8,85±0,005	0	983,33±88,93
Sabão	8,44±0,005	0,081±0,003	3125,92±92,36
óleo de motor usado	6,12±0,005	0	1912,5±132,75
Casca de abacate	6,04±0,0005	0,028±0,005	355,29±10,46
Casca de café	4,19±0,003	0	465,55±36,16
Ácido Palmítico	3,00±0,003	0,232±0,002	779,41±27,06
Ácido Mirístico	2,99±0,002	0,045±0,005	259±36,16
Mamona	2,65±0,001	0	119,41±33,4
Farelo de côco	2,59±0,003	0,071±0,003	500±3,5
Ácido Esteárico	2,59±0,003	0	504,76±13,23
Cera de abelha	2,03±0,004	0	5,14±7,95
Casca de kiwi	1,75±0,002	0	11,5±5,77
Ácido Láurico	1,21±0,002	0	9,30±3,4
Óleo de cozinha usado	1,06±0,002	0	5,68±61,93
Casca de Goiaba	0,072±0,005	0	28,66±0,26
Coentro em pó	0,069±0,005	0	13,22±0,33
Glicerina	0,067±0,002	0	16,15±0,21
Farelo de canola	0,050±0,007	0	0,72±0,36
Óleo de Motor	0,043±0,004	0	19,28±3,31
Casca de manga	0,041±0,003	0	11,81±0,39
Resíduo de enlatados	0,042±0,001	0	3,54±1,02
Casca de arroz	0,027±0,008	0	2,33±1,79
Coentro em grão	0,031±0,001	0	1,38±0
Casca de pêra	0,022±0,006	0	1,56±0,42
Hortelã	0,018±0,002	0	2±0,1
Casca de maracujá	0,018±0,001	0	7,5±0,12
Farelo de Malte	0,017±0,002	0	0
Semente de Abóbora	0,015±0,001	0,99±0,008	345,3333±0,095
Casca de caqui	0,012±0,002	0	830,5556±0,42
Casca de soja	0,010±0,002	0,0213±0,001	468,75±0

Figura 1 - Espectro de infravermelho médio para as amostras de farelo de casca Butiá (*Butiaodorata*). As flechas apontam para os números de ondas de cada respectivo grupo orgânico funcional.

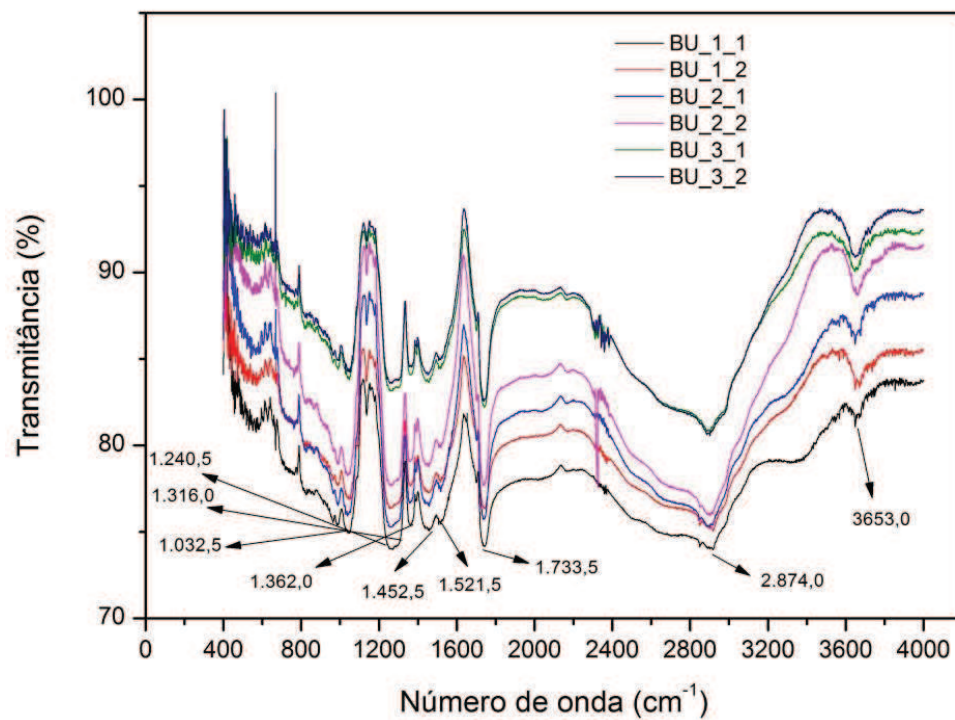


Tabela 2 - Principais grupos funcionais presentes no farelo de casca Butiá (*Butiaodorata*) e suas faixas espectrais experimentais, por meio de infravermelho no modo DRIFTS.

Grupos funcionais	Faixas espectrais experimentais (cm⁻¹)
C-O álcool (F) ou C-O éter (F)	1.032,5
C-O álcool (F)	1.240,5-1.316,0
C-O álcool (F)	1.362,0
CH ₃ de alcanos (m)	1.452,5
C=C (ArH) (m)	1.521,5
Carbonilade éster (F)	1.733,5
Carbono sp ³ (m)	2.874,0
Amida secundária (m)	3.653,0

(F) = intensidade forte, (m) intensidade média e (ArH) hidrogênio ligado ao anel aromático

Tabela 3 - Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para produção de lipases por *F. oxysporum*.

Corrida	Valores reais (codificados)				Atividade Lipásica (U/mL)
	Substrato (%)	pH	Tempo (dias)		
1	1,1 (-1)	4,2 (-1)	4,4 (-1)		6,09 ±0,245
2	1,1 (-1)	4,2 (-1)	8,6 (1)		9,34±0,298
3	1,1 (-1)	7,8 (1)	4,4 (-1)		9,38±0,704
4	1,1 (-1)	7,8 (1)	8,6 (1)		18,23±0,451
5	2,9 (1)	4,2 (-1)	4,4 (-1)		35,82±0,813
6	2,9 (1)	4,2 (-1)	8,6 (1)		30,09±0,390
7	2,9 (1)	7,8 (1)	4,4 (-1)		4,95±0,298
8	2,9 (1)	7,8 (1)	8,6 (1)		11,98±0,451
9	0,5 (-1,68)	6,0 (0)	6,5 (0)		19,02±0,983
10	3,5 (1,68)	6,0 (0)	6,5 (0)		18,50±0,983
11	2,0 (0)	3,0 (-1,68)	6,5 (0)		3,94±0,074
12	2,0 (0)	9,0 (1,68)	6,5 (0)		7,06±0,314
13	2,0 (0)	6,0 (0)	3,0 (-1,68)		4,55±0,282
14	2,0 (0)	6,0 (0)	10,0 (1,68)		8,04±0,538
15	2,0 (0)	6,0 (0)	6,5 (0)		24,88±1,847
16	2,0	6,0	6,5		24,75±0,225
17	2,0	6,0	6,5		20,19±0,225
18	2,0	6,0	6,5		20,19±1,579
19*	2,9	4,2	4,4		35,26±1,512

*Validação interna em triplicata

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão de lipases produzida por *F. oxysporum* cultivado em casca de butiá, e os valores de R² e F-valor.

Produção de lipases							
Termos	SQ	GL	QM	F	F tab	F/Ftab	R ²
M	3480,36	9	386,71	42,97	2,13	20,17	0,7768
R	1000,29	38	26,32				
T	4480,65	47					

Termos	Coefficientes	p-valor
Média/Intercep	22,201(±1,410)	0,000000
[S]	2,850(±0,764)	0,000548
[S] ²	0,039(±0,794)	0,960758
pH	-2,309(±0,764)	0,004181
pH ²	-4,647(±0,794)	0,000001
T	1,411(±0,764)	0,071527
T ²	-4,365(±0,794)	0,000002
[S]xpH	-7,646(±0,998)	0,000000
[S]xT	-1,351(±0,998)	0,182894
[pH]xT	2,296(±0,998)	0,026320

M = modelo; R = resíduo; T = Total; SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados; gl: grau de liberdade; F: F calculado; F tab: F tabelado 5%; [S]: concentração do substrato; T: tempo; pH: potencial hidrogênio. Os valores em negrito são estatisticamente significativos.

Figura 2 - Superfície de contorno para a produção de lipases por *F. oxysporum* cultivado em casca de butiá; (A) interação pH x S;(B) interação entre TxS e (C) interação TxpH.

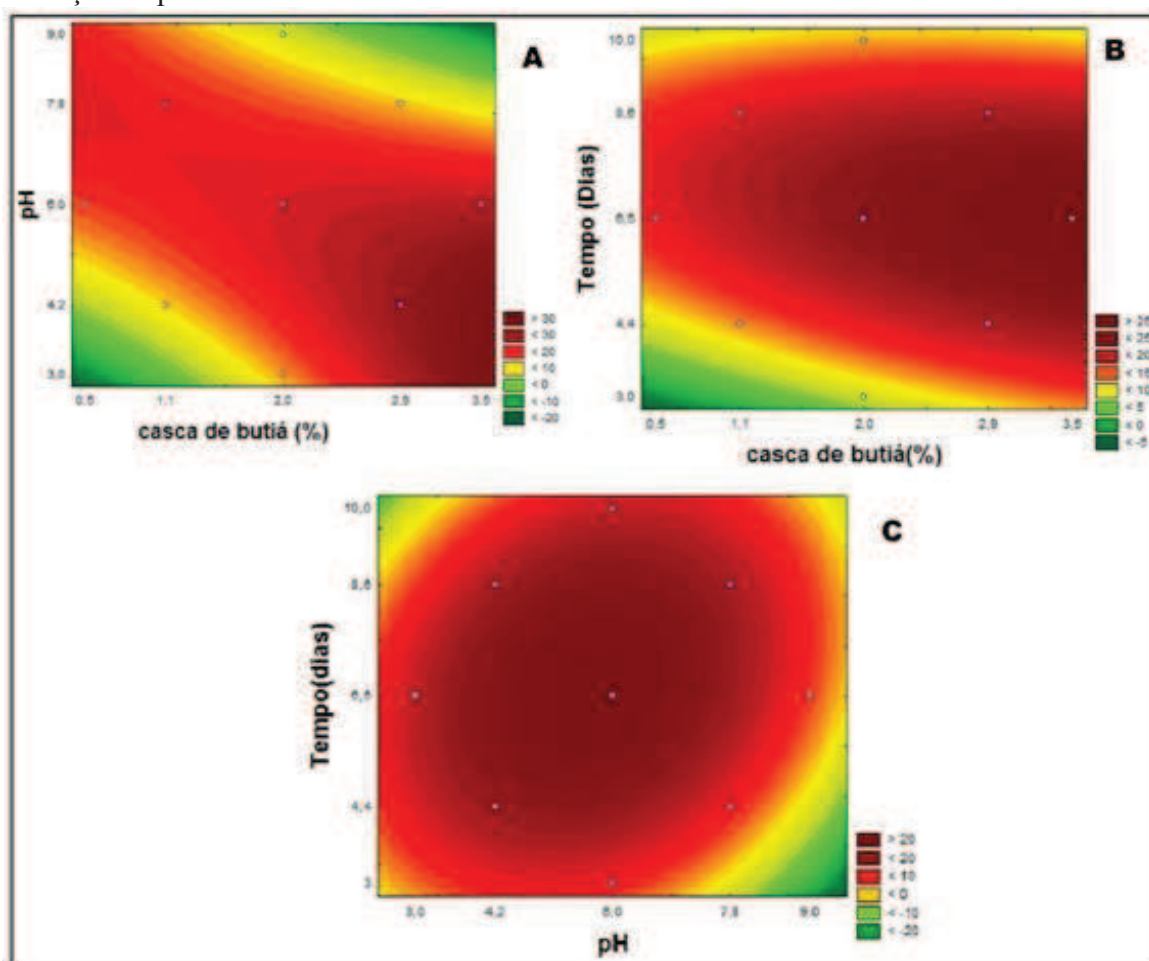


Figura 3 - Efeito da temperatura(A) e termoestabilidade (B) das lipases produzidas pelo fungo *F. oxysporum*.

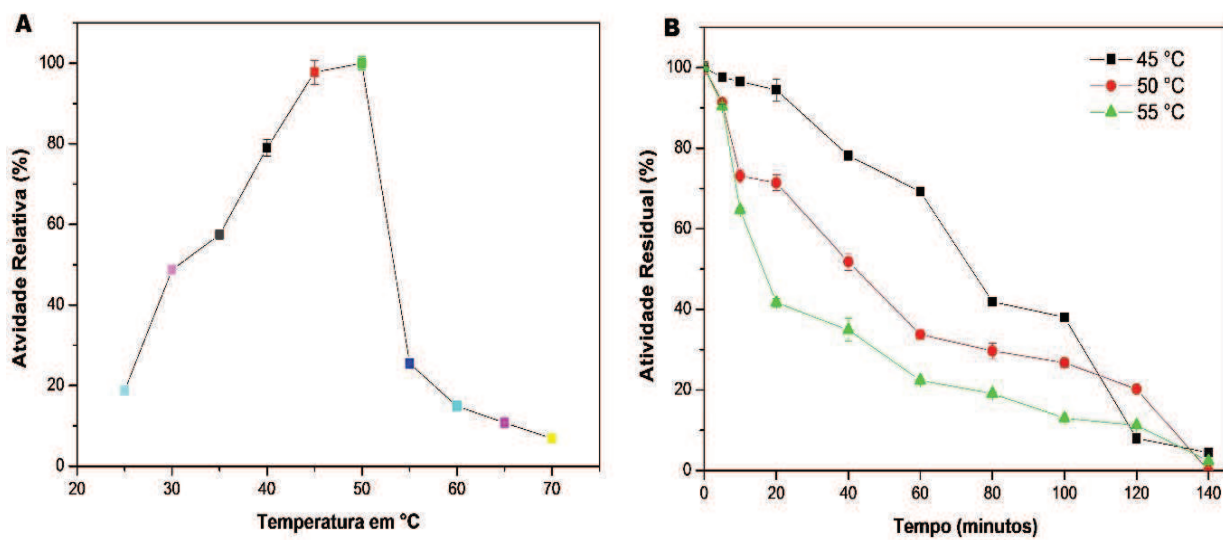


Figura 4 - pH ótimo de atuação (A) e estabilidade frente ao pH (B) das lipases produzidas pelo fungo *F. oxysporum*.

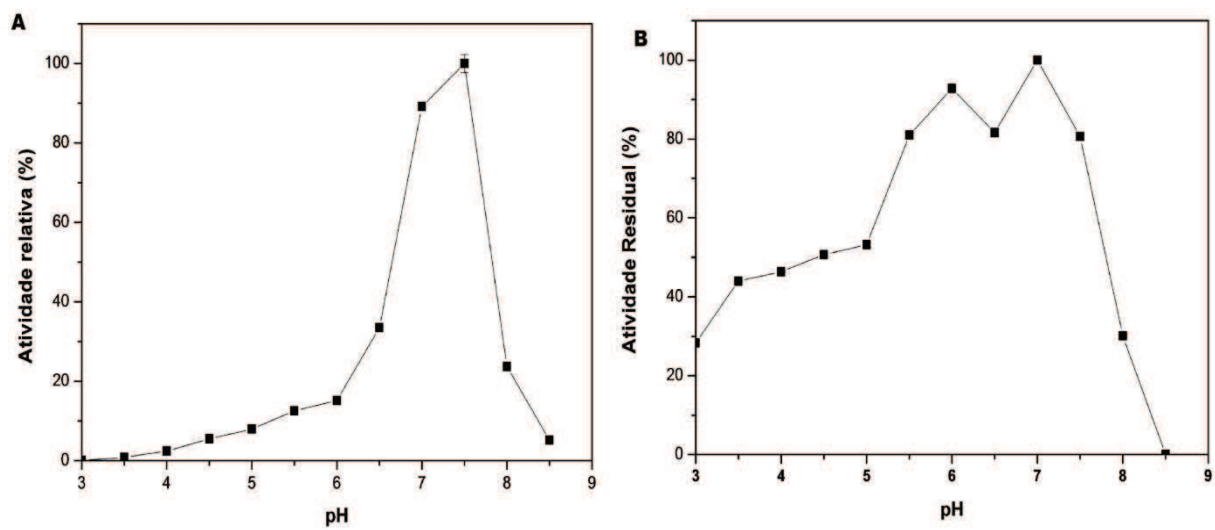


Figura 5 - Estabilidade das lipases produzidas por *F. oxysporum* frente a diferentes íons, substâncias(A) e surfactantes (B).

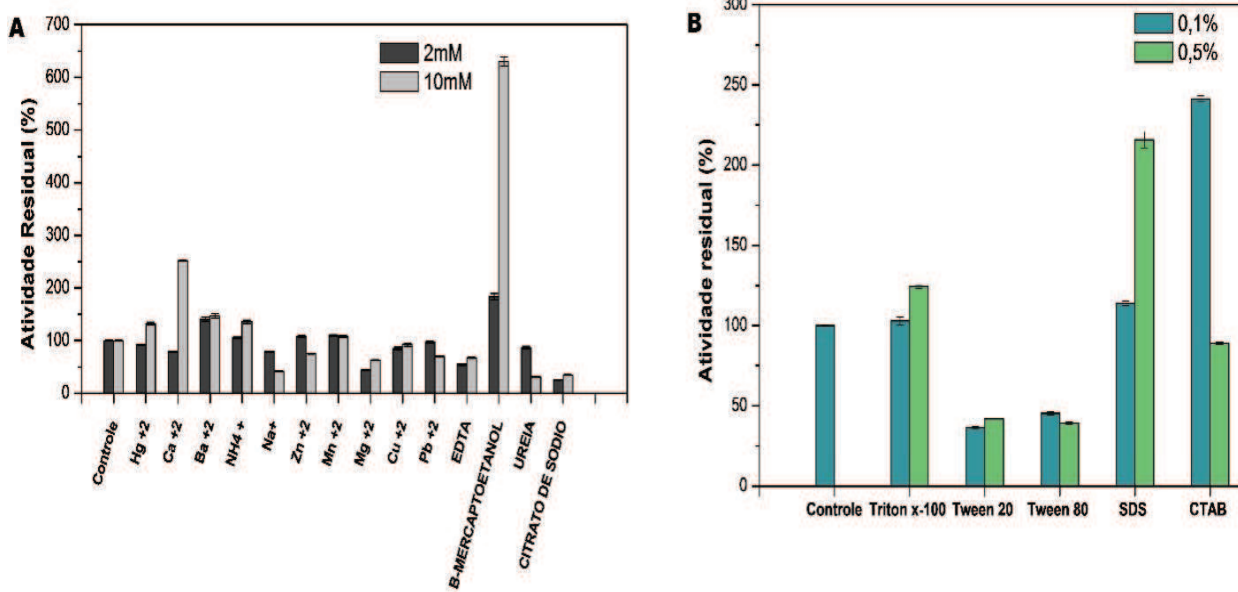
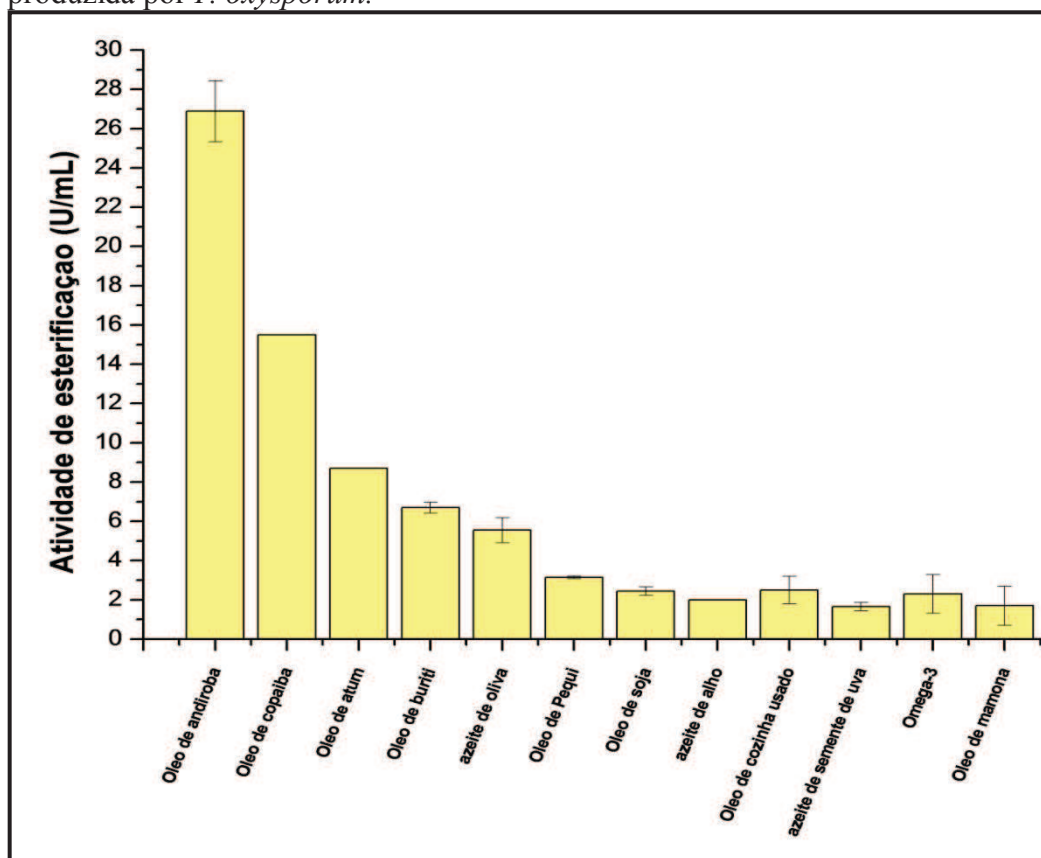


Tabela 5- Efeito de diferentes solventes sobre a atividade lipásica de *F. oxysporum*.

Solventes	Concentração			
	20%	40%	60%	80%
	Atividade Lipásica Residual (%)			
CONTROLE	100±0,760	100±0,760	100±0,760	100±0,760
1-PROPANOL	68,93±1,070	39,45±2,740	30,61±1,210	29,02±0,200
ACETONA	79,81±2,950	69,16±0,260	55,32±0,600	53,74±0,60
BUTANOL	55,93±0,890	54,79±0,940	46,10±0,330	35,33±0,330
DMSO	66,89±0,700	50,59±0,380	34,15±0,880	31,03±0,580
ETANOL	97,64±1,280	80,78±1,320	50,31±0,930	44,35±0,830
GLICEROL	91,69±0,760	67,17±0,330	51,49±1,110	48,89±0,790
HEXANO	129,25±0,870	97,99±0,290	80,82±0,630	63,65±1,150
METANOL	56,26±0,670	40,53±0,880	24,30±0,330	22,53±0,430
OCTANO	82,95±0,160	70,48±0,730	64,46±1,630	54,42±1,550
TOLUENO	82,38±1,380	48,56±0,840	46,86±0,610	25,51±0,500
XILOL	90,70±1,800	86,97±1,960	86,32±0,380	53,28±1,260

Figura 6- Atividade de esterificação frente a óleos de diferentes origens pela lipase produzida por *F. oxysporum*.



6. Considerações finais

Dentre 54 linhagens fúngicas isoladas a partir de ambientes distintos, a levedura L1 eo fungo filamentoso *F. oxysporum* destacaram-se em relação ao seu potencial lipolítico. A partir do emprego do DCCR e da MSR, elevados níveis de lipases foram produzidos pela levedura L1 quando o resíduo de queijo foi empregado como substrato. Ainda, estas ferramentas estatísticas se mostraram eficientes em elevar os níveis de lipases produzidas pelo *F. oxysporum*, quando a casca de butiá foi utilizada como única fonte de carbono. As lipases de *F. oxysporum* exibiram características bioquímicas interessantes, como boa estabilidade frente à temperatura e a uma ampla faixa de pH, bem como alta estabilidade frente a diferentes substâncias, sugerindo seu emprego na indústria de detergentes. Ainda, a atividade de esterificação verificada sob o óleo de andiroba sugere o emprego das respectivas enzimas no processo de produção de biodiesel. Por fim, o emprego da casca de butiá e do soro de queijo nos processos de produção de lipases, além de possibilitar a obtenção de níveis elevados destas enzimas, pode contribuir para a diminuição dos custos de produção enzimática, bem como evitar problemas ambientais decorrentes de sua deposição inadequada no meio ambiente, no caso do soro de queijo e na preservação da espécie através do manejo sustentável, no caso do Butiá.

7. Referências

ABADA, E. A. E. Production and characterization of a mesophilic lipase isolated from *Bacillus stearothermophilus* AB-1. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.11, p. 1100–1106. 2008.

ABD RAHMAN, R. N. Z. R. et al. *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. **BMC microbiology**, v. 7, p. 77, jan. 2007.

ALMEIDA, A. F. de; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid lipase from *Candida viswanathii*: production, biochemical properties, and potential application. **BioMed research international**, v. 2013, p. 435818, jan. 2013.

ALMEIDA, A. F. de; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1225–1234, 21 dez. 2012.

ALMEIDA, A. F. **Produção, purificação e propriedades bioquímicas de lipase ácida de *Cândida viswanathii***. Rio Claro, 216 p. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia aplicada). Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, Rio Claro, São Paulo, 2012.

ALVES, M.H. et al. Screening of *Mucor* spp. for production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 325-330 2002.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; REHMAN, S. Optimization of growth parameters for lipase production by *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. **Academic Journals** v. 10, n. 28, p. 5514–5523, 2011.

ARAÚZ, J. L.; JOZALA, A. F.; BARUQUE-RAMOS, J.; GAVA MAZOLA, P.; PESSOA JUNIOR, A.; VESSONI PENA, T. C. Culture medium of diluted skimmed

milk for the production of nisin in batch cultivations. **Annals of Microbiology**, v. 62, p. 419-426, 2012.

BADENES, S. M.; LEMOS, F.; CABRAL, J.M.S. Transesterification of oil mixtures catalyzed by microencapsulated cutinase in reversed micelles. **Biotechnology Letters**, v.32, p. 399-403, 2010.

BAJAJ A.; LOHAN P; JHA P. N; MEHROTRA R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 9-14, jan. 2010.

BALDASSO, C.; BARROS, T.C.; TESSARO, I.C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381-386, 2011.

BASHEER, S.M.; CHELLAPPAN, S.; BEENA, P.S.; SUKUMARAN, R.K.; ELYAS, K.K.; CHANDRASEKARAN, M. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment. **New Biotechnology**, v. 28, p. 627-638, 2011.

BASS, D.; BOYACI, İ. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 836-845, fev. 2007.

BEISSON, F. et al. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 2, p. 133-153, fev. 2000.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**. v. 76, n. 5, p. 965-77, 15 set. 2008.

BOX, G.B.P.; WILSON, K.B. On experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 13, p. 1-45, 1951.

BORNSCHEUER, U. T.; et al. **Lipase- catalyzed Synthesis of modified lipids. In: Lipids as Constitu- ents of Functional Foods**. Ed. F. D. Gunstone, P. J. Barnes & Associates, Bridgwater (UK), 2002 p. 149–182.

BRITO, Rafaela Rodrigues de. **Isolamento de fungos produtores de lipases catalisadoras de reações de transesterificação para produção de biodiesel**. 2012. p. 76. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2012.

BURGESS, L. W., B. A. SUMMERELL. Taxonomy of *Fusarium*: *Fusarium acuminatum* stat. & comb. **Myco-taxon** v. 75, p. 347-348. nov. 2000.

BURGESS, L.W.et al. Laboratory Manual for *Fusarium* Research, Sydney: University of Sydney, 1994. 133 p.

BUSSAMARA, R. et al. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot- plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology, Essex**, v. 101, p. 268-275, 2010.

BÜTOW, M. V. **Etnobotânica e caracterização molecular de *Butia* sp.** 2008. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

CAI, Y. et al. Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBC WU-3. **Process Biochemistry**, vol. 44, p. 786–790, 2009.

CAMARGO-DE-MORAES, M. M; et al. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 191-194, 2003.

CARVALHO, P. D. O. et al. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614–621, ago. 2005.

CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n.1, p.146-156, 2004.

CASTRO, I. M., M. C. LOUREIRO-DIAS. Glycerol utilization in *Fusarium oxysporum* var. lini regulation of transport and metabolism. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 1497-1502, 1991.

CIAFARDINI, G. Ã.; ZULLO, B. A.; IRIDE, A. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. **Food Microbiology**, v. 23, p. 60-67, 2006.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Belo Horizonte, 206 p., 2006. Tese (Programa de pós-graduação nível doutorado em Ciências de alimentos Faculdade de Farmácia). Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

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

COLLA, L. M; REINEHR, C. O; COSTA, J. A. V. Applications And Production Of Microbial Lipases. **Revista CIATEC – UPF**, v.4, n. 2, p.1-14, 2012.

COUTO, F. A. et al. Diversity and association of filamentous fungi in coffee beans under organic and conventional cultivation. **African Journal of Microbiology Research**. v. 8, n. 26, p. 2505–2512, 2014.

COUTO, S.; SANROMAN, M. Application of solid-state fermentation to food industry – a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, out. 2006.

DAMASO, M.C.T.; COURI, S.; PASSIANOTO, M.A.; FREITAS, S.C. Produção de lipases por fermentação semi-sólida tendo como indutores da síntese, subprodutos do refino do óleo de milho. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, Recife, **Anais...Recife**, 2005.

DIMITRIJEVIC, A. et al., One-step, inexpensive high yield strategy for *Candida antarctica* lipase A isolation using hydroxyapatite. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 358-362, 2012.

DUHART, B. T. et al. Biotransformation of protriptyline by filamentous fungi and yeasts. **Xenobiotica**, v.29, p. 733-746. 1999.

ERICSSON, D. J. et al. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of molecular biology**, v. 376, n. 1, p. 109–19, 8 fev. 2008.

FEITOSA, I. C. et al. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. **Acta Scientiarum. Technology**. v. 32, n. 1, p. 27–31, 1 jan. 2010.

FONSECA, L. X. **Caracterização de frutos de butiazeiro (*Butia odorata* Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi e estabilidade de seus compostos bioativos na elaboração e armazenamento de geleias**. Dissertação(Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindústria - nível Mestrado) Universidade Federal de Pelotas, 2012.

FONSECA, R. S. et al. Morfometria da flor e inflorescência de *Butia capitata* (Mart) Becc. (Arecaceae) em diferentes fases de desenvolvimento, no cerrado de Montes Claros - MG. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.1, p.657-659, 2007.

FREGOLENTE, P. B. L. et al. Screening of microbial lipases and evaluation of their potential to produce glycerides with high gamma linolenic acid concentration. **Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 40, n. 4, p. 747–56, out. 2009.

FUCIÑOS, P. et al. Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 117, p. 233-241, 2005.

GARCÍA-LEPE, R. et al. Lipases in autolysed cultures of filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 127–30, ago. 1997.

GILHAM, D.; LEHNER, R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro.

Methods, v. 36, p. 139-147, 2005.

GOLDLUST, A., BOHAK, Z.; Induction, purification and characterization of the nitrilase of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 11, p. 581-601, 1989.

GONÇALVES, F.A.G. et al. **Produção de lipase extracelular por levedura em cultivo submerso**. 2007. p. 67. Dissertação (de Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

GULATI, R. et al. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 251–262, 1 jan. 2005.

GUPTA R., et al. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.64, p. 763-781, 2004.

GUPTA, N.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 518–526, 2007.

GUPTA, P.; DUTT, K.; MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; SAXENA, R.K. Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4074–4076, 2009.

GURUNG, N. et al. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 329121, jan. 2013.

HASAN, F. et al. Enzymes used in detergents: Lipases. **African Journal of Biotechnology**. v. 9, n. 31, p. 4836–4844, Ago. 2010

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases.

Enzyme and Microbial Technology, v. 39, n. 2, p. 235-251, jun. 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 782-98, 2009.

HOSHINO, T. et al. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. lini. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, p. 660-664, 1992.

ILLANES, Andrés (Ed.). **Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications**. Springer Science, 2008. 391 p.

JELÉN, P. Whey processing. In: H. ROGINSKI, J. W. FUQUAY, P. F. FOX (ed.) **Encyclopedia of dairy sciences**. London: Academic Press. 2003. p. 2739-2751.

KANMANI, P. et al. The use of response surface methodology as a statistical tool for media optimization in lipase production from the dairy effluent isolate *Fusarium solani*. **ISRN Biotechnology**, v. 2013, p. 1-8, 2012.

KHURI, A.I.; MUKHOPADHYAY, S. Response surface methodology. **WIREs Computational Statistics**, v. 2, p. 128-149, 2010.

KIM, H.; YOUN, S.; SHIN, C. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol–fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. **Journal of biotechnology**, v. 123, n. 2, p. 174–184, 2006.

KIM, H.R. et al. Production of a novel cold-active lipase from *Pichia lynnferdii* Y-7723. **J. Agriculture Food Chemical**, vol. 58, p. 1322–1326., 2010.

KIM, S.-K. et al. Simple amino acid tags improve both expression and secretion of *Candida antarctica* lipase B in recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology and bioengineering**, 3 set. 2014.

KUMAR, S. S.; GUPTA, R. An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1054–1060, maio. 2008.

LACAZ, C da S, et al. **Fungos actinomicetos e algas de interesse médico**. Sarvier, São paulo, 1998, p. 445.

LARIOS, A. et al. Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 65, p. 373-376, 2004.

LESLIE, J. F., SUMMA RELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory manual**. Blackwell Publishing: Iowa, USA . 2006.

LI, N.; ZONG, M.H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal Molecular Catalyses B Enzymes**, v. 66, p. 43-54, 2010.

LIU, R. et al. A novel low-temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain *Fusarium solani* N4-2 for detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 3, p. 265–270, nov. 2009.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 672 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; COSTA, J.T.; CERQUEIRA, L.S.C.; FERREIRA, E. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. 3º ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2004. 375 p.

LORENZI, H.; NOBLICK, L.R.; KAHN, F.; FERREIRA, E. **Flora brasileira – Arecaceae (palmeiras)**. Nova Odessa: Plantarum, 2010. 384 p.

LOWE, D. A., ROMANCIK G.; ELANDER, E. P. Enzymatic hydrolysis of penicillin V to 6-aminopenicillanic acid by *Fusarium oxysporum*. **Biotechnology Letters**. v.8, p. 151-156, 1986.

MAFAKHER, L. et al. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. **New biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 337–40, 30 set. 2010.

MAIA, M. DE M. D. et al. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 4, p. 304–309, dez. 1999.

MALA, J. G. S. et al. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 247–53, ago. 2007.

MALDONADO, R. R. et al. Lipase Production Using Microorganisms from Different Agro-Industrial By- Products. **International Journal of Applied Science and Technology**. v. 4, n. 1, p. 108–115, jan. 2014.

MANNESSE, M. L. M. et al. Cutinase from *Fusarium solani* pisi hydrolyzing triglyceride analogues. Effect of acyl chain length and position in the substrate molecule on activity and enantioselectivity. **Biochemistry**, v.34, p. 6400-6407, 1995.

MARIN, R. et al. Propriedades nutracêuticas de algumas espécies frutíferas do sul do Brasil. In: **Espécies Frutíferas Nativas do sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa de Clima Temperado, 2004. p.107-122. (Embrapa Clima Temperado. Documento, 129).

MARTINS, K.M., **Variabilidade Genética De Isolados De Fusarium Spp. E Estudo Da Interação Com A Planta Hospedeira**. 2005. 87 f. Tese(Doutorado em Agronomia). Universidade de São Paulo, USP. Piracicaba, São Paulo, 2005.

MATEOS DIAZ, J. C. et al. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than

liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1042-1050, set. 2006.

MAURMANN, K. Como o manejo tradicional da folha de *Butia capitata* (Martius Beccari) pode promover a conservação dos buiazaís? 2013. Trabalho de conclusão de curso (Instituto de biociências UFRGS) Porto Alegre.

MENOCIN, S. et al. 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, p. 537-544, ago. 2010.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO J. R. A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídios. **Química Nova**, v. 28, p. 296-305, 2005.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 30 set. 2011.

MENDONÇA, L. A. **Desempenho do delineamento composto central em experimentos com alto coeficiente de variação**. 2012. Dissertação (Universidade Federal de Viçosa) Viçosa, MG, 2012.

MHETRAS, N.C.; BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1486-1490, 2009.

MOLLEA, C.; MARMO, L.; BOSCO, F. Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. In: MUZZALUPO, I. (Ed.). **Food industry**. New York: Intech, 2013.

MONTGOMERY, D.C. Experimental design for product and process design and development. **The Statistician**, v. 48, p. 149-177, 1999.

MORETTI, A. Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters. **Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke**, v. 2009. n. 117, p. 7-13, 2009.

NATH, A.; DIXIT, M.; BANDIYA, A.; CHAVDA, S.; DESAI, A. J. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5749-5755, 2008.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W.F.O. ***Fusarium* species: An illustrated manual for identification**. Pennsylvania State University Press, University Park. 1983.193p.

NWUCHE, C. O.; OGBONNA, J. C. Isolation of lipase producing fungi from palm oil mill effluent (pome) dump sites at Nsukka. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p.113–116, Fev. 2011.

NC-IUBMB (Ed.). Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB): Enzyme Nomenclature. Recommendations. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/cont3aa.html>>. Acesso em: 29 set. 2014.

NAZARENO, A. G. Conservação de *Butia eriospatha* (Martius ex Drude) Beccari (Arecaceae): Uma espécie de flora brasileira ameaçada de extinção. 2013. Tese (Programa de Pós Graduação em recursos genéticos vegetais da UFSC). Florianópolis 2013.

OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 13-21, 1999.

OLIVEIRA, B. H. et al. Comparison of lipase production on crambe oil and meal by *Fusarium* sp. (*Gibberella fujikuroi* complex). **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, n. 12, p. 1413–1425, 22 dez. 2014.

ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A. C. Artigo de Revisão. **SaBios: Revista Saúde e**

Biologia v. 7. n. 3. p. 97–109, 2012.

PABLINE, R. M. B. et al. Selection and optimization of extracellular lipase production using agro-industrial waste. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 566–573, 22 jan. 2014.

PACHECO, S. M. V. **Produção, Caracterização e Imobilização de Lipase de Fungo Filamentoso Isolado de Efluente De Abatedouro De Frangos**. 2012. 245 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

PANAGIOTOU, G. et al. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v.18, p. 37-45, 2003.

PANESAR, P.S., KENNEDY J.F., GANDHI D.N., BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1-14, 2007.

PAPAGORA, C.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 413-420, out. 2013.

PAQUES F. W, MACEDO G. A. Lipases of plants latex: properties and industrial applications. **Química Nova**. v. 29, p. 93-99, 2006.

PETERS, I.I.; NELSON, F.E. Factors influencing the production of lipase by *Mycotorula lipolytica*. **Journak Bacteriological**, v. 55, p. 581-591, 1948.

PRASAD M. P.; MANJUNATH K. Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 110, p.121-124, 2011.

PRAZERES, J. N.; CRUZ, J. A. B.; PASTORE, G. M. Characterization of alkaline

lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 505-509, 2006.

QUADROS, C.P.; BICAS, J.L.; NERI-NUMA, I.A.; PASTORE, G.M. Producing alkaline lipase by *Fusarium oxysporum* using unconventional medium components. **Food Science and Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 1-4, 2009.

RAMACHANDRAN, S.; SINGH, S. K.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications-a review. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2000-2009, 2007.

RAMOS, L. P. et al. Tecnologias de Produção de Biodiesel. **Revista Virtual Química**, v. 3, n. 5, p. 385-405, out. 2011.

RAPP, P. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum. **Enzyme Microbiology Technology**, v.17, p. 832-838, 1995.

RIBEIRO et al., Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme research**. vol. 2011, p. 16. 2011

RIFAAT, H. M. et al. Production, optimization and partial purification of lipase from *Fusarium oxysporum*. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**. v. 5, n. 1, p. 39-53, Fev. 2010.

RODRIGUES, C. **Seleção de fungos produtores de lipases a partir de resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental**. 2011. 195 f. Tese (Programa de Pós-graduação em engenharia ambiental). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, 2011.

ROSA, L.; CASTELLANI, T. T.; REIS, A. Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Martius) Beccari var. *odorata* (Palmae) na restinga do município de Laguna, SC. **Revista Brasileira de Botânica**, v.21, n.3, p, 1-16, 1998.

ROSSATO, M.; BARBIERI, R.L. Estudo etnobotânico de palmeiras do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 2, n. 1, p.997-1000, 2007

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126–131, mar. 2010.

RUEGGER, M. J. S. **Atividade enzimática e produção de ácido gama-linoleico por fungos filamentosos isolados do solo da Região do Banhado Grande, na Estação Ecológica Juréia-Itatins**. 2001.p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, São Paulo, 2001.

SAAD, M.; KANSOH, L.; GADALLAH, M. A. Optimization of extracellular lipase production by *Fusarium oxysporum*. **Arabian Journal of Biotechnology**,v. 8, n. 1, p. 19–28, jan. 2005.

SALAMEH, M. A; WIEGEL, J. Effects of detergents on activity, thermostability and aggregation of two alkalithermophilic lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. **The Open Biochemistry Journal**, v. 4, p. 22-8, jan. 2010.

SALIHU, A. et al. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36–44, jan. 2012.

SANDOVAL, G.; MARTY, A. Screening methods for synthetic activity of lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 390–393, fev. 2007.

SANTOS, R. C. A. et al. Evaluation of temperature and moisture response surface on the lipase from pumpkin seeds fermentation using *Aspergillus niger*. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 34, n. 3, p. 255-260, maio 2012.

SATHISH YADAV, K. N. et al. Differential induction, purification and characterization

of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10663-10670, 2011.

SAVITHA J. et al. Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. **African Journal Biotechnology**, v. 6, p. 564-568, 2007.

SBARDELOTTO, M. et al. Avaliação da produção de lipase microbiana a partir de *Aspergillus* sp. utilizando torta de canola como substrato. In: III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia. **Anais...**p. 293–296, 2013.

SCHWARTZ, E. **Produção, fenologia e qualidade dos frutos de *Butia capitata* em populações de Santa Vitória do Palmar**. 2008. 92 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

SEIFERT, K. A. et al. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. **Mycological Research**, v. 107, p. 643-644. 2003.

SGANZERLA, M. ZAMBIAZI, R. C.; BORGES, G. DA S. C. Extração de óleo da amêndoa de *Butia capitata*. In: Congresso de iniciação científica e encontro de pós graduação da UFPEL, 15., 8., 2006, Pelotas. **Anais do...** Pelotas: UFPEL, 2006. 1 CD-ROM.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; CHAND, U. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**. v. 19, p. 627-662, 2001.

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic solvent tolerant lipases and applications. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 625-658, jan. 2014.

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

SHIN, J.-A.; AKOH, C. C.; LEE, K-T. Enzymatic interesterification of anhydrous

butterfat with flaxseed oil and palm stearin to produce low-trans spreadable fat. **Food Chemistry**, v. 120, p. 1-9, 2010.

SILVA, Cleber Luiz Maia da. **Obtenção de ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol**. 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas, 2005.

SILVA, G. S. et al. Seleção e imobilização de fungos filamentosos produtores de lipases intracelulares. **Anais...XVII Simpósio nacional de bioprocessos**. p. 1-6, 2009.

SILVA, M. F. et al. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 119-123, 2009.

SINGH, A. K, Mukhopadhyay, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 166, p. 486-520, 2012.

SINGH, A., KUMAR P. K. R.; SCHUEGERL, K. D. Xylose fermentation and catabolism in *Fusarium oxysporum*. **Biochemistry International**. v. 27, p. 831-839, 1992.

SINGH, A., SCHUEGERL, K. Induction and regulation of D-xylose catabolizing enzymes in *Fusarium oxysporum*. **Biochemistry International**, v. 28, p. 481-488, 1992.

SINGH, R. et al. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 70, n. 6, p. 679-82, maio 2006.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 11, p. 656-660, nov. 2003.

SPALATELU, C. Biotechnological valorization of whey. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 10, p. 1-8, 2012.

STEELE, D.B.; STOWERS, M.D. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, p. 89-106, 1991.

ST- GERMAIN G., SUMMERBELL, R. **Identifying filamentous fungi: A clinical laboratory handbook**. Editora Star. Califórnia, USA. 1996. p. 314.

SUIHKO, M. L., SUOMALAINEN I., ENARI, T. M..D-xylose catabolism in *Fusarium oxysporum*. **Biotechnology Letters**. v.5, p. 525-530, 1983.

SUN, S. et al. Solid state fermentation of rice chaff for fibrinolytic enzyme production by *Fusarium oxysporum*. **Biotechnology Letters**, v.19, n.5, p. 465-467, 1997.

SUN, S. et al. New solid-state fermentation process for repeated batch production of fibrinolytic enzyme by *Fusarium oxysporum*. **Process Biochemistry**, v. 33, n.4, p. 419-422, 1998.

TALUKDER, M. M. R. et al. Potential use of whole cell lipase from a newly isolated *Aspergillus nomius* for methanolysis of palm oil to biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 108-113, maio 2013.

TEIXEIRA, Evilácio Luz. **Produção de Biodiesel através da hidroesterificação do óleo de andiroba(*Carapa guianensis*-Aubl) via catálise heterogênea ácida**. 2011. p.88. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Engenharia Química)-Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Belém, Pará, 2011.

TENG, Y.; XU, Y. A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. **Analytical biochemistry**, v. 363, n. 2, p. 297-309, 15 abr. 2007.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, abr. 2006.

The Novozyme Report 2011. disponível em :

<<http://report2011.novozymes.com/Service/Download+report/The-Novozymes-Report-2011.pdf>>. Acessado em:

TOMMASO, G.; MORAES, B. Z.; MACEDO, G. C.; SILVA, G. S.; KAMIMURA, E. S. Production of lipase from *Candida rugosa* using cheese whey through experimental design and surface response methodology. **Food Bioprocess and Biotechnology**, v. 4, p. 1473-1481, 2011.

TREICHEL H, et al. A review on microbial lipases production. **Food Bioprocess Technology** v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

TWIGG, L. E.; SOCHA L. V. Defluorination of sodium monofluoroacetate by soil microorganisms from central Australia. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 33, p. 227-234, 2001.

USTARIZ, F.; LACA, A.; GARCIA, L. A.; DIAZ, M. Mixed cultures of *Serratia marcescens* and *Kluyveromyces fragilis* for simultaneous protease production and COD removal of whey. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 864-870, 2007.

VALLADÃO, A.B.G.; TORRES, A.G.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C. Profiles of fatty acids and triacylglycerols and their influence on the anaerobic biodegradability of effluents from poultry slaughterhouse. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7043-7050, 2011.

VASILJEVIC, T.; JELEN, P. Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. **Innovative Food Sciences and Emerging Technologies**, v. 2, p. 75-85, 2001.

VERMA, N.; THAKUR, S.; BHATT, A.K. Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). **International Research Journal of Biological Sciences**, v.1, p. 88-92, 2012.

VOIGT, C.A.; SCHÄFER, W.; SALOMON, S. A secreted lipase of *Fusarium*

graminearum is a virulence factor required for infection of cereals. **The Plant Journal**, v. 42, p. 364-375, 2005.

WENE, E. G., ANTONPOULOS, A. A. D-xylose fermentation by *Fusarium oxysporum* strains. **Biomass**, v. 17, p. 13-20, 1988.

WITEK-KROWIAK, A. et al. Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 150–60, maio 2014.

WOLSKI, E. et al. Production and partial characterization of lipases from a newly isolated *Penicillium* sp. using experimental design. **Letters in applied microbiology**, v. 49, n. 1, p. 60–6, jul, 2008.

YANG, J.-Y. et al. Expression of an uncleavable N-terminal RasGAP fragment in insulin-secreting cells increases their resistance toward apoptotic stimuli without affecting their glucose-induced insulin secretion. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 38, p. 32835-32842, 23 set. 2005.

YAO, H.; et al. Biomimetic affinity purification of *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 3896-3900, 2011.

YOO, H-Y. et al. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6104-6111, 2011.