



Bioprospecção de fungos filamentosos com atividade lipolítica

Thayná Marães de Souza.^{1*}, Karen Andreza da Silva Xavier¹, Jennifer Salgado da Fonseca², Ricardo Lima Serudo^{2,3}

Resumo

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise e síntese de triacilgliceróis, cujas apresentam estabilidade em diversos solvente orgânicos, assim, chamadas de biocatalisadores. Estas geram matéria-prima para a obtenção de produtos e processos de alto valor comercial. Foram selecionados e identificados cinco fungos filamentosos oriundos do solo Amazônico e, a partir da análise qualitativa (*cup-plate*), o com melhor resposta para produção de lipase foi submetido à fermentação submersa (FS), utilizando planejamento fatorial completo 2⁵. A maior atividade enzimática obtida foi 1905,23 U/mL nas condições de 45°C, pH 11, 4,5 % de substrato, 150 rpm e 8 dias, porém idealmente se deve incubar a 25°C. Com a análise dos dados, foi possível formular um modelo matemático linear para descrever a produção enzimática com os fatores estudados.

Palavras-chave: *Aspergillus*; Lipases; Fermentação submersa; Planejamento fatorial.

Bioprospection of filamentous fungus with lipolytic activity. The Lipases are enzymes that catalyze the hydrolysis and synthesis of triacylglycerols, which have stability in several organic solvents, thus called biocatalysts. These generate raw material to obtain products and processes of high commercial value. Five filamentous fungus from the Amazonian soil were selected and identified from the qualitative analysis (*cup-plate*), the one with the best response to lipase production was submitted to submerged fermentation (SF), using complete factorial design 2⁵. The highest enzymatic activity was 1905.23 U/mL under the conditions of 45°C, pH 11, 4.5% of substrate, 150 rpm and 8 days, but ideally should incubate at 25°C. With the data analyses, was possible to formulate a linear mathematical model to describe the enzymatic production with the factors studied.

Keywords: *Aspergillus*; Lipases; Submerged fermentation; Factorial planning.

¹Graduanda de engenharia química, da Escola Superior de Tecnologia (EST), da Universidade do Estado do Amazonas - UEA, Manaus - AM, Brasil.

Autor para correspondência: thaynamaraes97@gmail.com

²Pesquisador no HUB – Tecnologia e Inovação, Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Manaus – AM, Brasil.

³Professor Adjunto de Química, da Escola Superior de Tecnologia (EST), da Universidade do Estado do Amazonas - UEA, Manaus - AM, Brasil.

1. Introdução

As lipases (E.C 3.1.1.1) são enzimas que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras, liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Estas são o terceiro maior grupo de enzimas produzidos comercialmente, onde os valores podem chegar a R\$2000, em média, 1 grama. A procura por elas aumentou e deve-se ao fato de possuírem uma ação incomum: são solúveis em água, entretanto, catalisam reações que têm substratos lipofílicos (CARVALHO et al., 2003; CASTRO et al., 2004; COLLA et al., 2012; GUPTA, 2006; KLOBITZ, 2008; MOURA et al., 2013).

O mercado brasileiro enzimático é estimado em cerca de USD 200 milhões. As principais empresas produtoras de lipases comerciais são: Sigma, DYE Trade e Thermo Fisher. Os custos para empregar lipases em indústrias ainda são elevados devido ao fato de que as enzimas devem ser ativas e estáveis em pH, temperatura, e condições específicas de cada processo. Assim, é necessário investir em equipamentos e processos produtivos (ABRANTES, 2002; BECKER, 2007; MATIAS et al., 2005; MESSIAS et al., 2011).

Estima-se que pouco menos de 5% dos fungos já foram identificados no bioma Amazônico. Assim, a bioprospecção de fungos filamentosos constitui uma atividade promissora para detectar novos compostos de alto valor comercial com atividades biológicas de interesse em uma ampla gama de setores. (CARVALHO et al., 2005; NETO et al., 2008; ORLANDELLI et al., 2012).

Este trabalho objetiva selecionar novos microrganismos com potencial para produzir lipase, contribuindo para confirmar a riqueza e importância da microbiota regional para utilização biotecnológica. Ademais, obter enzimas com alta velocidade de síntese, facilidade para manipulação ambiental e mais estável do que as enzimas de origem animal e vegetal (HASAN et al., 2006; KLOBITZ, 2008; MESSIAS et al., 2011; REINEHR et al., 2014).

2. Material e métodos

2.1 Fungos filamentosos

Os fungos utilizados neste estudo são oriundos do solo Amazônico. O material biológico foi coletado na Escola Superior de

Tecnologia situada na Avenida Darcy Vargas, 1.200, Parque Dez de Novembro, Manaus – AM em junho de 2016, sendo preservados na micoteca do Laboratório ILUM – HUB.

Para efeito de cultivo e reativação, foram inoculados 50µL da água com esporos de cada fungo em meio Sabouraud. Foram armazenados à 30 °C por sete dias, com o crescimento sendo acompanhado diariamente.

Os fungos foram inoculados em meio líquido Manachini (KH₂HPO₄: 2g, (NH₄)₂SO₄: 1g, MgSO₄.7H₂O: 0,1 g, NaH₂PO₄.H₂O: 0,9g, Tampão McIlvaine pH 4, extrato de levedura: 1g) com 1 mL de óleo de fritura durante 2 dias e 28°C para a obtenção de extratos enzimáticos.

2.2 Seleção de microrganismos produtores de lipase

Utilizando meio seletivo para lipase (ágar nutriente: 2 g, CaCl₂.H₂O: 0,01g, tween 80: 1 mL, água destilada: 99 mL), foram feitos poços de 8 mm no meio contido em placas de petri e acrescentados 50 µL dos extratos de cada fungo nos poços, incubando a 37°C durante 48 horas de acordo com a metodologia descrita por (HABA et al., 2000).

A observação da reação enzimática positiva foi visualizada com a formação de halos com pequenos cristais em torno dos *cup-plates*. O ensaio qualitativo através da atividade enzimática foi determinado pelo tamanho do halo em milímetros, medindo-se o diâmetro do halo pelo reverso da placa de Petri e aplicando na fórmula abaixo (TEIXEIRA et al., 2011).

$$I = \frac{\text{diâmetro do halo (mm)}}{\text{diâmetro do poço (mm)}}$$

2.3 Identificação dos microrganismos

Após a obtenção de cultura pura, os fungos isolados foram identificados pelas técnicas convencionais: análise das características macro e microscópicas, conforme as recomendações de BARNETT e HUNTER, 1972, SAMSON e PITT, 1985, RAPER e THOM, 1968, RAPER e FENNEL, 1977 e PITT, 1985.

2.4 Fonte de carbono

Como indutor de fonte de carbono para a produção de lipase, foi utilizado óleo de

fritura residual de soja em residências de parceiros do projeto usuários da mesma marca de óleo. O tempo de fritura estimado é de 15 minutos e foi utilizado para fritar a 100 °C.

2.5 Design experimental

Os testes procederam utilizando meio mínimo de Manachini (2g de KH_2PO_4 : 1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0,1g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,9g de $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 1g de Extrato de levedura: 1L de tampão) em erlenmeyers de 125 mL somente para o fungo indicado na fase de seleção como sendo o ideal.

As condições indicadas no Planejamento Fatorial completo 2^5 foram geradas no programa Statistica v. 12. O planejamento visou estudar da influência do tempo (2 – 8 dias), pH (4 – 11), e concentração da fonte de carbono (0,5 - 4,5%) no volume total do meio (50 mL), temperatura (25 - 45°C) e agitação (50 - 150 rpm), obtendo como resposta a atividade enzimática de lipase (U/mL), conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1 - Níveis dos fatores utilizados no planejamento experimental

Fatores	Valores		
	-1	0	+1
Concentração de carbono (%)	0,5	2,5	4,5
Temperatura (°C)	25	35	45
Agitação (rpm)	50	100	150
pH	4	7,5	11
Tempo (dias)	2	5	8

As variáveis foram escolhidas para, assim, analisar a interação eletrostática, a interação da enzima com o substrato, assim como desnaturação ou não enzimática e período fermentativo.

2.6 Determinação quantitativa de atividade lipolítica

A dosagem foi realizada para análise da amostra e controle, de acordo com a metodologia descrita por (HENRY, 1957; ROE, 1963; WILLIANSO, 1975) utilizando kit colorimétrico para lipase da marca *In Vitro*.

Foi colocado em microplaca 50µL de solução tampão Tris 0,1 mol/L, 2,5 µL de amostra, 2 µL de inibidor (fenil-metil-sufonil fluoreto 20mmol/L em etanol), e 5 µL de reagente de cor. Depois disso, a amostra foi aquecida no monobloco por 2 minutos a 37°C. Em seguida, foram acrescentados 5µL de substrato (BALB 20 mmol/L) para nova incubação por 30 minutos a 37°C. Após esse período, foram adicionados 100µL de inativador (Lauril sulfato de sódio 27,6 mmol/L). A leitura foi feita a 410 nm no Espectrofotômetro da marca Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., LTD. modelo MR-96A.

2.7. Análise estatística

Os resultados foram analisados no Statistica versão 12.0 para a geração de gráficos de superfície e modelo matemático, além da análise variância (ANOVA) com $p = 0,05$. Além disto, também foi realizado o Teste F para averiguar a qualidade do modelo gerado.

3 Resultados e Discussão

Inicialmente, houve a seleção de microrganismos produtores de lipase utilizando método *cup-plate* (Tabela 2). Apesar de não apresentar a maior atividade lipolítica (U/mL), o fungo IL-SOL 5 foi selecionado para seguir com o estudo, uma vez que degradou todo o substrato durante a fermentação líquida na obtenção inicial dos extratos, diferente dos demais fungos.

As colônias com maior diâmetro de halo não foram as mesmas que apresentaram maior atividade enzimática. Dessa forma, ao se avaliar as colônias para selecionar uma boa como produtora de enzima lipolítica, não se deve ter como referência apenas as informações sobre a atividade enzimática, mas também deve-se considerar o crescimento do microorganismo no meio de cultura seletivo.

A maioria dos fungos foram identificados como do gênero *Aspergillus sp.* Estes também foram identificados por PIROTA et al. (2015) no bioma amazônico e por GADDEYYA et al. (2012), ao analisar solos agrícolas.

Tabela 2 - Identificação, ensaio qualitativo e quantitativo dos fungos selecionados.

Identificação	Fungo	Ensaio qualitativo (I)	Ensaio quantitativo (U/mL)
IL-SOL 4	<i>Aspergillus sp</i>	4,25	24,633
IL-SOL 5	<i>Aspergillus terreus</i>	4	28,683
IL-SOL 6	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,25	30,917
IL-SOL 12	<i>Aspergillus aculeatus</i>	3,12	23,377
IL-SOL 14	Não identificado	3,75	12,484

Os fungos desse gênero têm sido alvos de diversos estudos devido ao seu potencial biotecnológico. De acordo com CARVALHO et al. (2005), HASSAN et al. (2006) e MENDES et al. (2005), os fungos desse gênero são ótimos produtores de lipase.

Os microorganismos identificados apresentaram uma boa atividade enzimática quando comparados com outros autores utilizando *Aspergillus*, como: ROVEDA et al. (2010) que obteve 7,1 U/mL utilizando azeite de oliva como indutor, SILVA et al. (2017) com 2,5 U/mL em 48 horas e CARVALHO et al. (2005) que obteve 7,6 U/mL ao utilizar *Aspergillus niger* e 9,5 U/mL com *Aspergillus oryzae* após 48 h de incubação a 30 °C.

Após executados todos os experimentos previstos no planejamento fatorial, foram observadas grandes diferenças nas produções enzimáticas ao fazermos mudanças em algum ou em todos os fatores do planejamento. Desta forma, o resultado dos experimentos obtidos, de acordo com seus níveis baixos (-1), central (0) e altos (+1), segue na Tabela 3.

O experimento 32 obteve a maior atividade lipolítica de 1905,23 U/mL. Este valor é extremamente superior quando comparada com os estudos de HIOL et al. (2000), que obtiveram 120 U/mL de atividade lipolítica em cultivos otimizados de *Rhizopus oryzae* incubado por 4 dias, de Tan et al. (2004) com 500 U/mL a 28°C por 96 horas utilizando *Penicillium cammembertii* e de Kaushik et al (2010) utilizando *Aspergillus terreus* com 7,01 U/mL em 96 horas.

No experimento 13, obteve-se a atividade lipolítica mais baixa (7,736 U/mL), porém ainda é superior aos dados coletados por COIMBRA et al. (2012), que obteve 6,22 U/mL após fermentação em meio líquido composto

por farelo de trigo com 50% de umidade e por PAGLIA et al. (2016) com 4,25 U/mL.

A estimativa de efeitos (Tabela 4) avaliou os efeitos de recuperação dos elementos após aplicação do planejamento fatorial 2⁵, tendo como referência os valores determinados na produção de lipase via *Aspergillus terreus* (IL-SOL 05). Nos efeitos estimados, encontra-se: o “teste T” (distribuição de student), que é usado para avaliar o nível de confiança (95%) em relação ao grau de liberdade.

Para serem significativos estatisticamente, os valores encontrados devem ser maiores que o $t_{\text{crítico}}$, sendo assim foi significativo o valor da média, os fatores substrato, pH, temperatura e tempo, assim como das interações agitação x substrato, agitação x pH, agitação x temperatura, substrato x pH e substrato x tempo.

A temperatura atuou com efeito antagônico no metabolismo do fungo, isto é, quanto maior o valor, pior será a produção lipolítica do mesmo. Diferentemente ao encontrado por TOMBINI et al (2015), onde o tempo de cultivo não teve efeito significativo ao nível de 95% de confiança sobre a atividade de lipase. Em relação aos outros fatores e interações significativos, quando estes aumentarem, a produção enzimática também aumentará, pois atuam com efeito sinérgico.

Mesmo que a agitação se faça necessária para ter-se uma melhor biodisponibilidade de nutrientes, conforme CIHANGIR e SARIKAYA (2004) e SIRISHA et al. (2010), a mesma sozinha não se mostrou significativa. Entretanto, a interação desta com outros fatores como temperatura, pH e substrato foi extremamente significativa, como é mostrado na Tabela 4.

Tabela 3 - Atividade lipolítica usando IL SOL-05 nos parâmetros do planejamento 2⁵.

Teste	Agitação (rpm)	Óleo (%)	pH	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Atividade lipolítica (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
1	-1	-1	-1	-1	-1	47,116	9,31
2	+1	-1	-1	-1	-1	51,59	7,49
3	-1	+1	-1	-1	-1	21,98	4,44
4	+1	+1	-1	-1	-1	164,98	16,02
5	-1	-1	+1	-1	-1	309,65	75,04
6	+1	-1	+1	-1	-1	32,31	23,09
7	-1	+1	+1	-1	-1	262,17	51,09
8	+1	+1	+1	-1	-1	20,03	1,92
9	-1	-1	-1	+1	-1	73,37	13,82
10	+1	-1	-1	+1	-1	44,04	13,79
11	-1	+1	-1	+1	-1	17,23	1,33
12	+1	+1	-1	+1	-1	-	-
13	-1	-1	+1	+1	-1	7,74	0,41
14	+1	-1	+1	+1	-1	17,23	15,49
15	-1	+1	+1	+1	-1	39,58	17,79
16	+1	+1	+1	+1	-1	86,22	5,47
17	-1	-1	-1	-1	+1	1.485,88	270,65
18	+1	-1	-1	-1	+1	213,57	96,00
19	-1	+1	-1	-1	+1	251,00	1.165,81
20	+1	+1	-1	-1	+1	294,29	51,91
21	-1	-1	+1	-1	+1	72,53	10,64
22	+1	-1	+1	-1	+1	148,22	18,36
23	-1	-1	+1	-1	+1	1.596,06	626,47
24	+1	+1	+1	-1	+1	1.162,46	483,52
25	-1	-1	-1	+1	+1	145,15	11,36
26	+1	-1	-1	+1	+1	80,91	16,22
27	-1	+1	-1	+1	+1	137,61	69,72
28	+1	+1	-1	+1	+1	119,73	10,80
29	-1	-1	+1	+1	+1	102,56	10,66
30	+1	-1	+1	+1	+1	54,94	4,86
31	-1	+1	+1	+1	+1	43,77	2,69
32	+1	+1	+1	+1	+1	1.905,23	371,30
33 (C)	0	0	0	0	0	1.632,09	136,01
34 (C)	0	0	0	0	0	406,56	30,21
35 (C)	0	0	0	0	0	567,15	44,78

Tabela 4 - Efeitos estimados dos testes do planejamento fatorial 2⁵ para produo de enzimas lipolíticas usando *Aspergillus terreus* (IL SOL-05).

Variáveis	Efeitos	Teste T
Média/Interao	298,081	21,22922
Agitao	-13,601	-0,46312
Substrato	202,220	6,88549
pH	169,515	5,77191
Temperatura	-203,658	-6,93447
Tempo	413,667	14,08517
Agitao x Substrato	186,545	6,35176
Agitao x pH	137,676	4,68780
Agitao x Temperatura	231,266	7,87450
Agitao x Tempo	31,703	1,07946
Substrato x pH	344,071	11,71547
Substrato x Temperatura	25,709	0,87537
Substrato x Tempo	198,578	6,76151
pH x Temperatura	35,386	1,20488
pH x Tempo	125,188	4,26260
Temperatura x Tempo	-125,607	-4,27687

*Dados em negrito representam os fatores e interaes significativos no sistema.

Desta forma, houve variao na agitao dos experimentos que obtiveram melhores resultados, pois, quando a interao da agitao e temperatura aumentou, obtiveram-se as duas maiores atividades lipolíticas (U/mL), identificadas nos experimentos 32 e 33. O efeito da temperatura e do tempo influenciaram em atividades mdias como no experimento 23 e 17. Alm disso, o aumento da interao entre agitao e pH resultou em uma produo mais baixa no experimento 24 comparado aos demais.

Ademais, os valores encontrados mostraram-se superiores quando comparados a outros autores como HIOL et al.(1999) que utilizou *Mucor hiemalis* produzindo menos de 100 U/mL, TAN et al. (2004) produziu lipase a partir do *Penicillium camembertii* obtendo 80 U/mL e a partir do *Rhizopus sp.* obtendo 579,4 U/mL de atividade lipolítica.

Os dados do planejamento geraram um modelo com explicao de 60% dos fenmenos atravs da anlise de variância (ANOVA). Para validar o modelo, empregou-se o teste F, que é usado para medir a preciso. Quanto maior o F, melhor, pois significa que os quadrados mdios do modelo são maiores que os quadrados

mdios residuais.

Os valores obtidos do Teste F em relao à regresso e à falta de ajuste esto representados nas equaes 2 e 3 abaixo.

$$\frac{\text{Mdia quadrática da regresso}}{\text{Mdia quadrática resíduo}} = 48,36 > F_{1,33}$$

(Equao 1)

$$\frac{\text{Mdia quadrática devido a falta de ajuste}}{\text{Mdia quadrática erro experimental}} = 7331,91 > F_{1,32}$$

(Equao 2)

Como o valor encontrado à falta de ajuste foi maior do que o esperado, tem-se se a necessidade de ajustar o modelo pois, podem haver variáveis que ainda não foram estudadas. Entretanto, considera-se que o modelo estatístico obtido foi adequado para a descrio da produo de lipase do *Aspergillus terreus*, pois a variável explicada é igual a 60%.

A partir dos resultados encontrados no teste F, obteve-se um modelo matemático da atividade lipolítica significativo em um intervalo de confiana de 95%, onde foram incluídos os coeficientes correspondentes aos

efeitos significativos, conforme apresentados na Equação 3.

$$\begin{aligned} \text{Atividade lipolítica } \left(\frac{U}{mL}\right) = & 298,081 - \\ & 6,801x_1 + 101,110x_2 + 84,757x_3 - \\ & 101,829x_4 + 206,833x_5 + 93,272x_6 + \\ & 68,838x_7 + 115,633x_8 + 15,851x_9 + \\ & 172,035x_{10} + 12,854x_{11} + 99,289x_{12} + \\ & 17,693x_{13} + 62,594x_{14} - \\ & 62,804x_{15} \text{ (Equação 3)} \end{aligned}$$

Onde x_1 é agitação (rpm), x_2 é substrato (%), x_3 é pH, x_4 é temperatura ($^{\circ}C$), x_5 é tempo (dias), x_6 é interação agitação x substrato, x_7 é interação agitação x pH, x_8 é interação agitação x temperatura, x_9 é interação agitação x tempo, x_{10} é interação substrato x pH, x_{11} é interação substrato x temperatura, x_{12} é interação substrato x tempo, x_{13} é

interação pH x temperatura, x_{14} é interação pH x tempo, x_{15} é interação temperatura x tempo.

A Equação 3 obtida através do software Statistica encontra-se codificada. Dessa forma, para fazer uso da mesma tem-se a necessidade de utilizar os níveis (-1, 0, +1) correspondentes aos valores dos fatores de interesse a serem utilizados no modelo.

Por meio das superfícies de resposta (Figura 1 e 2), pode ser verificada uma tendência de maior atividade lipolítica quando empregada as condições de maior concentração do substrato e maior pH. De fato, observando-se os resultados descritos na Tabela 1 e 2, os melhores resultados de atividade de lipase foram obtidos quando estes estavam nessas condições.

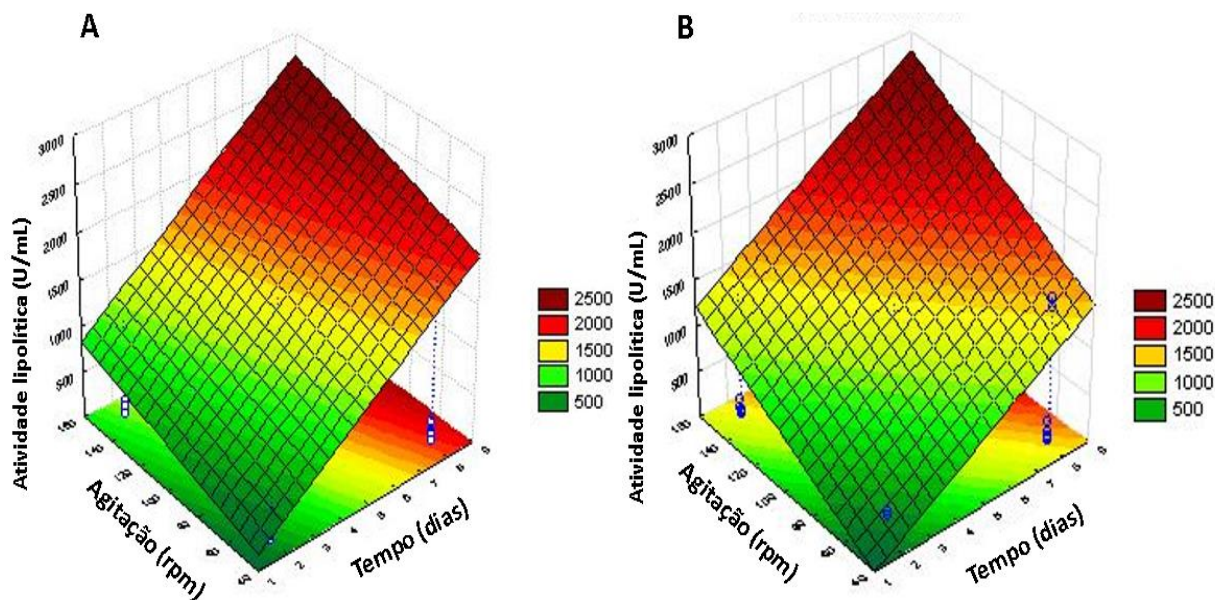


Figura 1 - Superfície de resposta de atividade enzimática de lipase em diferentes faixas de agitação (rpm) e tempo (dias) produzida por *Aspergillus terreus* em pH 11 e 10% de substrato em A) 25 $^{\circ}C$ e em B) 45 $^{\circ}C$.

O efeito das variáveis agitação (rpm) e tempo (dias) a 25 $^{\circ}C$ é mostrado na Figura 1a. Nos níveis máximos de agitação (150 rpm) e tempo (8 dias) foram obtidas as mais elevadas porcentagens de atividade lipolítica (2800 U/mL), com valores fixados de pH (11), temperatura (25 $^{\circ}C$) e concentração de substrato (10%).

Na Figura 1b é mostrado o efeito das variáveis agitação (rpm) e tempo (dias) a 45 $^{\circ}C$.

A superfície de resposta mostrou que o aumento destas duas variáveis influenciou favoravelmente na atividade lipolítica, com aproximadamente 2800 U/mL.

Comparando os dois gráficos observou-se que não há diferença ao utilizar 25 $^{\circ}C$ ou 45 $^{\circ}C$ pois, obtêm-se uma ótima atividade enzimática em ambos. Isso ocorre devido a interação temperatura x agitação ter sido significativa conforme Tabela 4. Consequentemente, ao aumentar a temperatura,

a agitação também aumenta e então, a produção aumenta (figura 1a). Como a agitação não foi significativa e a temperatura possui efeito antagônico à produção, a atividade enzimática aumentará quando esta diminuir (Figura 1b).

Em temperaturas superiores a 45°C, foi observada uma drástica redução da porcentagem de atividade específica devido à inativação da enzima em elevadas temperaturas, ou seja, desnaturação da enzima pelo calor (Murray et al., 2003). E em temperaturas inferiores a 24 °C, a porcentagem de atividade específica poderia diminuir devido

ao aumento da viscosidade da emulsão pela aglomeração das gotas de óleo, favorecida com a redução da temperatura.

De acordo com GULATI et al (1999) e SHARMA et al (2005), para as lipases fúngicas, a faixa de temperatura encontrada para a máxima produção está entre 25 a 40°C e para KNOB et al (2015) encontrou-se de 5 a 45°C. A partir dos resultados obtidos, observou-se que a temperatura ótima foi de 25°C para produção de lipase via *Aspergillus terreus*, pois possuiu efeito antagônico ao processo e em altas temperaturas a enzima desnatura.

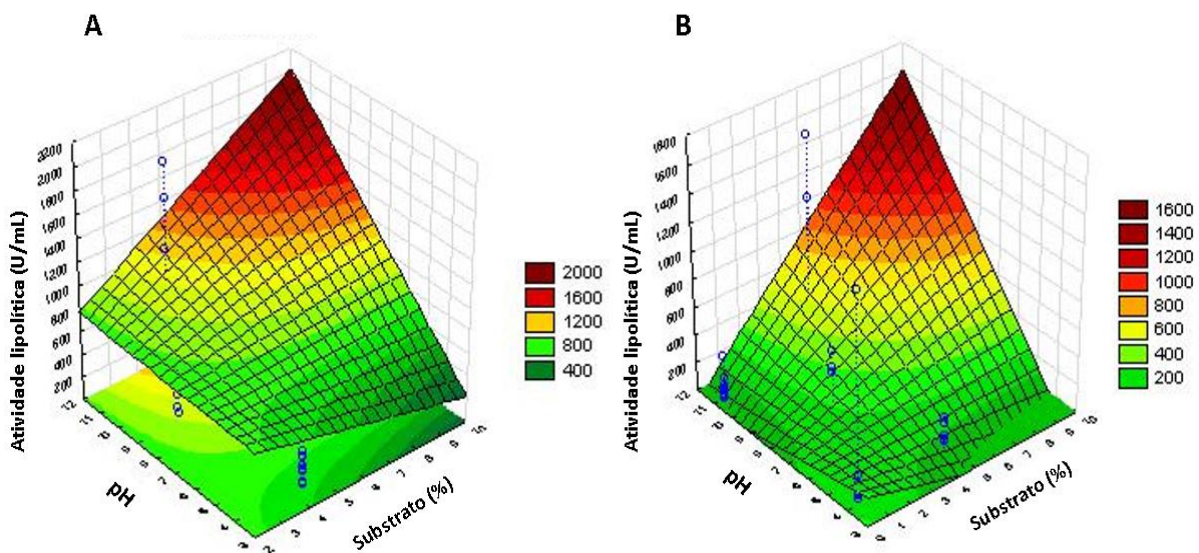


Figura 2 - Superfície de resposta de atividade enzimática de lipase em diferentes faixas de pH e concentração de substrato produzida por *Aspergillus terreus* em 50 rpm e 8 dias em A) 25°C e em B) 45°C.

Nos níveis máximos de pH (11-12) e concentração de substrato (9-10%) foi obtida a maior atividade lipolítica (2000 U/mL) na figura 2a, com valores fixados de tempo (8 dias), temperatura (25°C) e agitação (50 rpm).

Na Figura 2b, a superfície de resposta mostrou que o aumento do pH e concentração de substrato (%) influenciou em uma boa atividade lipolítica (1600 U/mL), em 8 dias, 45°C e agitação (50 rpm).

A interação da agitação com os demais fatores se faz necessária para obter-se alta atividade lipolítica. Como isso não ocorreu, obteve-se uma baixa atividade conforme é mostrado na figura 2a, onde a agitação e temperatura encontram-se baixas assim como na figura 4b, onde a agitação encontra-se baixa,

mas a temperatura alta, então, as condições não estão otimizadas para efetuarem uma boa interação para a produção.

Ao utilizar 50 rpm para produção de lipase observou-se que a faixa do pH e concentração de substrato (%) permaneceram alta. Em relação ao pH, enzimas lipolíticas possuem ótima atividade em uma escala entre 3 a 12. De acordo com a literatura, o pH neutro é geralmente definido como ótimo para atividade lipolítica como pode ser verificado nos trabalhos de TAN et al. (2003), ABBAS et al. (2002), KAMINI et al. (1998) e FADILU et al. (1997), favorecendo, assim, o crescimento celular.

Ademais, GULATI et al (2005), variou o pH do meio na faixa entre 3 a 10, onde os resultados obtidos demonstraram que a



atividade lipolítica máxima foi produzida em pH 7, apesar de que o microrganismo fosse capaz de crescer nas outras faixas de pH.

4. Conclusão

Após identificar cinco fungos oriundos do solo Amazônico, a espécie *Aspergillus terreus* foi considerado o melhor produtor de lipase. Com os resultados obtidos no planejamento fatorial completo, a melhor condição para a produção de lipase pelo IL-SOL 05 em fermentação submersa foi observada quando a temperatura se encontra próxima de 25°C, pH 11, concentração de óleo de fritura próximo de 5%, agitação de 150 rpm e tempo variando entre 7 e 8 dias (experimento 21), em que nessas condições obteve-se ótima atividade lipolítica (1162,46 U/mL) sem a necessidade de estressar o fungo. Além disso, pôde-se obter uma visão geral da estimativa de efeitos e ANOVA. Assim, para a atividade enzimática da produção de lipase por *Aspergillus terreus*, o fator mais significativo é o tempo, em seguida a temperatura, a interação entre agitação e temperatura, substrato, interação entre a agitação e o substrato e interação entre agitação e o pH.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório de Biotecnologia – HUB pelo suporte intelectual e financeiro.

6. Divulgações

Este artigo é inédito. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

7. Referências

ABBAS, H.; HIOL A.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 968–975, 2002.

ABRANTES, J. S. **Bio (sócio) diversidade e Empreendedorismo Ambiental na**

Amazônia. Rio de Janeiro: Garamond, 2002. 142 p.

ARAGÃO, V.C; ANSCHAU, A.; PORCIUNCULA, B.D.A.; THIESEN, C.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2268-2272, 2009.

BECKER, B. K. Proposta de política de ciência e tecnologia para a Amazônia. **Parcerias Estratégicas**, v.19, p.47-55, 2007.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

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

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 193-97, 2004.

COIMBRA M. C.; PINTO T. O. P.; CRUZ V. A.; NETO P. O. Seleção de fungos isolados do ambiente com atividade lipolítica. **Revista Inst. Adolfo Lutz**, v. 72, n. 1, p. 50-5, 2012.

COLLA, M.L.; REINEHR, O.C.; COSTA, V.A.J. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC – UPF**, vol. 4, n. 2, p.1-14, 2012.

FADIOGLU, S.; SOYLEMEZ, Z. Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil. **Food Research International**, v.30, p.171-175, 1997.

FEITOSA, I. C.; BARBOSA, J. M. P.; ORELLANA, S. C.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. 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, 2010.



- FREIRE, D. M. A.; CASTILHO, L. R. **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado. Lipases em biocatálise.** Corvo, M. L. (Ed.). Rio de Janeiro: Editora Interciência, p. 108-123. 2008.
- GADDEYYA, G.; NIHARIKA, P. S.; BHARATHI, P.; KUMAR, P. K. R. Isolation and identification of soil mycoflora in different crop fields at Salur Mandal. **Advances in Applied Science Research**, v.3, n.4, p.2020-2026, 2012.
- GULATI, R.; ISAR, J.; KUMAR, V.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S.; SAXENA, R. K. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. **PureAppl. Chem.**, v. 77, n. 1, p. 251–262, 2005.
- GULATI, R.; SAXENA, R.K; GUPTA, R.;YADAV, R.P.; DAVIDSON, W.S. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. **Process Biochem.**, v. 35, n. 1, p. 459-464, 1999.
- GUPTA, V. K. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: *Aspergillus* System Properties and Applications. **Elsevier**, v. 1, n.1, p. 6–200, 2006.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n.1, p. 235-251, 2006.
- HIOL, A.; JONZO, M. D.; DRUET, D.; COMEAU, L. C. Production, purification and characterization of an extra cellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n.1, p. 80–87, 1999.
- HIOL, A. M.; JONZO, M. D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, n.1, p.421-430, 2000.
- HOPKINS, M. J. G. Herbário instituto nacional de pesquisas da amazônia, amazonas (inpa). **Unisanta BioScience**, v. 4, n. 6, p. 52-56, 2015.
- KAMINI, N.R.; MALA, J.G.S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger*, by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**, v.33, n.5, p. 505-511, 1998.
- KAUSHIK, R.; MARWAH, R.G.; GUPTA, P.; SARAN S.; SASO L.; PARMAR V. S.; SAXENA R. K. Otimização da Produção de Lipase de *Aspergillus terreus* pela Metodologia da Superfície de Resposta e seu Potencial para a Síntese de Glicerídeos Parciais sob Condições Livres de Solventes. **Indian J. Microbiol**, v. 50, n. 4, p. 456–462, 2010.
- KNOB, A.; TOMBINI, J.; CUNHA, M. A. A. C.; LIMA, V. L. Caracterização Bioquímica de Lipase Obtida por Fermentação do Farelo de Soja em Cultivo em Meio Sólido. **Anais do V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**, v. 1, n. 2, p; 367, DOI 10.5151/biochem-vsimbbtcc-22151.
- KOBLITZ, B. G. M. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 256 p.
- MATIAS, E., PIMENTEL, N. Biotecnologia: Um desafio para o Amazonas. **Parcerias Estratégicas**, v. 21, n.1, 2005.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.
- MOURA, L. F. W. G.; OLIVEIRA, M. V.; LÔ, M. M.; MOTA, J.G.S.M.; MAGALHÃES, E. A.; LIMA, M. C. L.; MAGALHÃES, F. E. A. Bioprospecção de atividade lipolítica de fungos anemófilos isolados do centro vocacional tecnológico de Tauá-CE. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.15, n.2, p. 157-165, 2013.
- MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. M. **Manual of clinical microbiology**. 8. ed. Washington: ASM Press, p. 2113, 2003.
- MURUCI, L. N. M.; SANTOS, L. O.; COURI, S.; PENHA, E. M.; DAMASO, M. C. T. Melhoramento da Produção de Lipase de *Aspergillus niger* em Fermentação Semi-sólida Utilizando Subprodutos Agroindustriais. **Anais do XVIII nacional simpósio de bioprocessos**, Caxias do Sul, 2011.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298 p.
- NETO, R. B.; JESUS, M.A.; ZUCARATTO, R. **Guia de fungos macroscópicos da reserva florestal Adolpho Ducke.** Manaus: INPA -



Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2008. 22 p.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina**, v. 32, n. 2, p. 213- 234, 2011.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

PAGLIA, D. L.; KEMPKA, A. P.; CAVALHEIRO, D.; RIGO, E. Desenvolvimento de suporte de imobilização de lipases e estudo das condições operacionais para as reações de hidrólise. **In: 26º Seminário de Iniciação Científica**, Chapecó-SC, 2016.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. Acinetobacter baumannii: Emergence of a Successful Pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 1, p. 538–582, 2008.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTOI, M.; DELABONAI, P. S.; TREMACOLD, C. R.; FARINASI, C. S. Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. **Cienc. Rural**, v.45, n.9, p. 1606-1612, 2015.

REINEHR, C. O.; RIZZARDIA, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Produção de lipases de aspergillus niger e aspergillus fumigatus através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.

REINEHR, C. O.; BORTOLUZZI, L.; MORAIS, V. Q.; SMANIOTTO, T. M.; ZEN, C. K.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Produção de Lipases com Atividade de Hidrólise por Aspergillus Utilizando Subprodutos Agroindustriais, Óleo de Soja e Glicerol. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 1, p; 97-115, 2016.

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. **Cienc.**

Tecnol. Aliment., v. 30, n.1, p. 126-131, 2010.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2005.

SILVA, A. F. L.; FILHO, D. F.; ALVES, F. M.; CARVALHO, S. A. Imobilização em poliuretano de fungo filamentosos produtor de lipase. **57º Congresso Brasileiro de Química**, Gramado, 2017.

SIRISHA, E.; RAJASEKAR, N.; NARASU, M. L.; Isolation and Optimization of Lipase Producing Bacteria from Oil Contaminated Soils. **Adv. Bio**, v.4, n.5, p. 249-252, 2010.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing Candida sp. and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**. v. 39, n.1, p. 459-465, 2003.

TAN, T.; ZHANG, M.; XU, J.; ZHANG, J. Optimization of culture conditions and properties of lipase from Penicillium camembertii Thom PG-3. **Process Biochemistry**, v. 49, n.1, p. 1495-1502, 2004.

TEIXEIRA, M.F.S.; SILVA, T. A.; PALHETA, R.A.; CARNEIRO, A.L.B.; ATAYDE, H.M. Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas). **EDUA**, Editora da Universidade Federal do Amazonas, v. 1, n.1, p. 230-236, 2011.

TOMBINI, J.; CUNHA, M. A. A. C.; LIMA, V. A. Fermentação Sólida de Farelo de Soja para Produção de Lipase: Avaliação dos Parâmetros Concentração de Inóculo, Umidade e Tempo de Cultivo. V simpósio de Bioquímica e Biotecnologia. In: **Anais do V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**, v. 1, n. 2, p. 368, 2015.

TRIGUEIRO, M. G. S. **Sociologia da Tecnologia: Bioprospeção e Legitimação**. São Paulo: Centauro Editora, 2009. 200 p.

ZAVASCKI, A. P.; CARVALHAES, C. G.; RENATA C PICÃO, R. C.; GALES, A. C. Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n.1, p. 71-93, 2010.