



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

IZABELA BARBOSA

Síntese e caracterização da lipase de *Aspergillus oryzae*

Araraquara, SP

2023

IZABELA BARBOSA

Síntese e caracterização da lipase de *Aspergillus oryzae*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Ariela Veloso de Paula

Araraquara, SP

2023

B238s Barbosa, Izabela.
Síntese e caracterização da lipase de *Aspergillus oryzae* /Izabela
Barbosa. – Araraquara: [S.n.], 2023.
51 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de
Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Área de
Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Álvaro de Baptista Neto.
Coorientadora: Ariela Veloso de Paula.

1. Lipase. 2. *Aspergillus oryzae*. 3. Sacarose. 4. Sulfato de amônio. I.
Baptista Neto, Álvaro, orient. II. Paula, Ariela Veloso de, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família que me encorajou e esteve ao meu lado durante todos esses anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto, e à minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Ariela Veloso de Paula, que compartilharam comigo ensinamentos e se dispuseram de tempo para que eu pudesse concluir esse trabalho.

A todos os professores e técnicos do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia por todo conhecimento transmitido.

Agradeço também aos funcionários e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara por fazerem parte da minha jornada.

E aos meus amigos, por tornarem essa jornada da graduação mais leve, feliz e especial.

Tenho ciência que sem o apoio dessas pessoas eu não teria chegado até aqui. Muito obrigada!

RESUMO

Tendo em vista que enzimas possuem grande importância industrial, esse trabalho teve como objetivo estudar a síntese e caracterização de lipase de *Aspergillus oryzae*, uma vez que são biocatalisadores versáteis e com grande potencial em diversas aplicações. Para isso, foi necessário avaliar as características morfológicas do fungo e estudar algumas condições de cultivo, como o pH, tempo de fermentação e composição do meio de cultivo em relação as fontes de carbono e nitrogênio, bem como caracterizar a lipase quanto ao pH e a temperatura ideais. Na primeira etapa, o cultivo do *Aspergillus oryzae* em placas de Petri possibilitou a caracterização qualitativa do mesmo, que cresceu formando colônias de coloração amarelo-esverdeada. Nas etapas seguintes, foram realizados planejamentos experimentais de forma a aprimorar o processo e otimizar o tempo e custos de análise. Com base no delineamento composto central (DCC) 2³ realizado em shaker, o melhor tempo de fermentação foi em 120h, com pH 6, 4,5 g/L de sulfato de amônio e 14 g/L de sacarose, obtendo-se lipase com atividade hidrolítica de $94,33 \pm 5,51$ U/mL. Por fim, através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) de 2 fatores realizado em shaker, a lipase apresentou pH ideal de 7,5 e temperatura ideal de 30°C. Diante disso, este trabalho permitiu a definição de melhores parâmetros para síntese da lipase de *Aspergillus oryzae* e sua caracterização, recomendando-se que trabalhos futuros estudem a especificidade da enzima e suas possíveis aplicações.

Palavras-chave: Lipase. *Aspergillus oryzae*. Sacarose. Sulfato de amônio.

ABSTRACT

Considering that enzymes are of great industrial importance, this work aimed to study the synthesis and characterization of lipase from *Aspergillus oryzae*, as they are versatile biocatalysts with great potential in various applications. For this, it was necessary to evaluate the morphological characteristics of the fungus and study culture parameters, such as pH, fermentation time and composition of the production medium in relation to carbon and nitrogen sources, as well as to characterize the lipase as to its ideal pH and temperature. In the first stage, the cultivation of *Aspergillus oryzae* in Petri dishes allowed the qualitative characterization of it, which grew forming colonies of greenish yellow color. In the following stages, experimental designs were made in order to improve the process and optimize time and cost of the analysis. Based on the central composite design (CCD) 2^3 performed in a shaker, the best fermentation time was 120 hours, with pH 6, 4.5 g/L of ammonium sulfate and 14 g/L of sucrose, obtaining lipase with hydrolytic activity of 94.33 ± 5.51 U/mL. Finally, through a central composite rotational design (CCRD) with two factors performed in a shaker, the lipase had an ideal pH of 7.5 and an ideal temperature of 30°C. Thus, this work allowed the definition of the best parameters for the synthesis of lipase from *Aspergillus oryzae* and its characterization, recommending that future studies investigate the enzyme's specificity and its potential applications.

Keywords: Lipase. *Aspergillus oryzae*. Sucrose. Ammonium sulphate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema dos principais fatores que influenciam a síntese de lipase por fungos	17
Figura 2 - Fluxograma da produção e estudo da lipase de <i>Aspergillus oryzae</i>	21
Figura 3 - Cultivo do <i>Aspergillus oryzae</i> em placas de Petri com meio PDA e Sabouraud após 5 dias	26
Figura 4 - Cultivo de colônias de <i>Aspergillus oryzae</i> em placa de Petri com meio PDA nas concentrações de 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} ao logo de 4 dias.....	27
Figura 5 - Cultivo de uma colônia isolada de <i>Aspergillus oryzae</i> em placa de Petri com meio PDA, do dia 1 ao dia 5 (da esquerda para a direita).....	28
Figura 6 - Cultivo do <i>Aspergillus oryzae</i> em tubo inclinado após 5 dias.....	28
Figura 7 - Cultivo do <i>Aspergillus oryzae</i> em PDA após 2 meses armazenado a 4°C	29
Figura 8 - Gráfico da atividade hidrolítica da lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> após 96h e 120h de cultivo	31
Figura 9 - Gráfico da atividade hidrolítica da lipase de <i>A. oryzae</i> após 120h e 144h de cultivo utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio	32
Figura 10 - Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados (standardized effect) de pH, concentração de sacarose (Cs) e concentração de sulfato de amônio (Cn) na atividade da lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> , com $\alpha=0.05$	37
Figura 11 - Gráfico de superfície mostrando a atividade hidrolítica (U/mL) da lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> em função da concentração de sulfato de amônio (Cn, g/L) e pH	37
Figura 12 - Gráfico de superfície mostrando a atividade hidrolítica da lipase (U/mL) de <i>Aspergillus oryzae</i> em função da concentração de sacarose (Cs, g/L) e pH	38
Figura 13 - Gráfico de superfície mostrando a atividade hidrolítica (U/mL) da lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> em função da concentração de sulfato de amônio (Cn, g/L) e da concentração de sacarose (Cs, g/L).....	38
Figura 14 - Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados (standardized effect) de pH e temperatura (T) na atividade da lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> , com $\alpha=0.05$	42
Figura 15 - Gráfico de superfície mostrando a atividade hidrolítica (U/mL) da lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> em função da temperatura (°C) e do pH	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de aplicações industriais de diversas enzimas em seus respectivos setores	11
Tabela 2 - Faixa e níveis das variáveis do DCC 2 ³ com 3 pontos centrais	23
Tabela 3 - Faixa e níveis das variáveis do DCCR de 2 fatores com 3 pontos centrais	24
Tabela 4 - Atividade hidrolítica da lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> obtida por cada meio após 96h de cultivo	29
Tabela 5 - Resultados do teste ANOVA para comparação entre os meios de cultivo, com $\alpha=0.05$	30
Tabela 6 - Resultados de atividade hidrolítica da lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> obtidos pelo DCC 2 ³ com 3 pontos centrais	35
Tabela 7 - Resumo do modelo estatístico utilizado na avaliação dos resultados do DCC 2 ³ com 3 pontos centrais	36
Tabela 8 - Resultados de atividade hidrolítica da lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> obtidos pelo DCCR de 2 fatores	40
Tabela 9 - Resumo do modelo estatístico utilizado na avaliação dos resultados do DCCR de 2 fatores	41

SUMÁRIO

1	Introdução	9
2	Objetivos	10
2.1	Objetivo geral	10
2.2	Objetivos específicos	10
3	Revisão bibliográfica	10
3.1	Enzimas	10
3.2	Lipases	13
3.2.1	Fungos produtores de lipase	14
3.2.1.1	<i>Aspergillus oryzae</i>	15
3.3	Variáveis e condições que afetam a síntese e atividade da lipase	16
3.3.1	Temperatura e pH	17
3.3.2	Indutor	18
3.3.3	Fontes de carbono e nitrogênio	18
3.3.4	Tipo de cultivo	19
3.4.5	Tempo de cultivo	20
4	Materiais e métodos	20
4.1	Microrganismo	21
4.2	Estudo de morfologia e seleção de linhagens mais produtivas do fungo	21
4.3	Avaliação da composição de meios de cultivo para cultivo submerso	22
4.3.1	Ensaio preliminar 1	22
4.3.2	Ensaio preliminar 2	22
4.4	Avaliação de parâmetros para a produção de lipase	23
4.4.1	Avaliação do efeito do tempo de cultivo	23
4.4.2	Avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio	23
4.4.3	Avaliação do efeito do pH, da concentração de açúcar e da concentração de sulfato de amônio	23

4.5 Caracterização da lipase	24
4.6 Determinação da atividade hidrolítica.....	24
5 Resultados e discussão.....	25
5.1 Estudo de morfologia	25
5.2 Avaliação da composição de meios de cultivo para cultivo submerso	29
5.3 Avaliação de parâmetros para a produção de lipase.....	31
5.3.1 Efeito do tempo de cultivo.....	31
5.3.2 Efeito das fontes de carbono e nitrogênio.....	32
5.3.3 Efeito do pH, concentração de açúcar e concentração de sulfato de amônio	35
5.4 Caracterização da lipase	40
6 Conclusão	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 Introdução

Enzimas são biocatalisadores largamente empregados no setor industrial, sendo esperado que no período de 2018 a 2023, o mercado de enzimas industrialmente relevantes cresça 4,9%, atingindo os 7 bilhões de dólares em 2023 (LÓPEZ-FERNÁNDEZ; BENAIGES; VALERO, 2020). Quando comparadas a catalisadores químicos, as enzimas permitem que o processo seja realizado em condições mais brandas, com menos formação de subprodutos, maior seletividade e especificidade e menor toxicidade (LÓPEZ-FERNÁNDEZ; BENAIGES; VALERO, 2020). De acordo com estimativas, microrganismos foram responsáveis por 70% da produção de enzimas industriais em 2017, sendo que atualmente 58% das enzimas utilizadas são produzidas por fungos filamentosos e leveduras, 30% por bactérias, 8% por animais e 4% por plantas (RIGO et al., 2021).

Dentre as principais enzimas com aplicação industrial encontram-se as lipases (triacilglicerol acil hidrolase, E.C. 3.1.1.3), que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras, liberando glicerol e ácidos graxos. Além disso, realizam a síntese de ésteres a partir de glicerol e ácidos graxos, através das reações de esterificação ou transesterificação (UGO et al., 2017; LÓPEZ-FERNÁNDEZ; BENAIGES; VALERO, 2020). De forma geral, as principais aplicações da lipase são na indústria de leite, alimentos, bebidas, biocombustível, farmacêutica, têxtil, cosméticos e biorremediação. Grande parte dessas lipases são obtidas de fungos, como a lipase de *Candida rugosa*, aplicada no tratamento de lodo ativado e no tratamento aeróbio de resíduos, e a lipase de *Rhizopus arrhizus*, utilizada na produção de ésteres para conferir aromas e sabor a alimentos (CHANDRA et al., 2020).

Para a aplicação de enzimas, é muito importante que as lipases utilizadas tenham alta atividade catalítica e estabilidade operacional, entretanto, existem desafios na sua aplicação industrial, como o alto custo e a necessidade de especificidade de acordo com o tipo de reação a ser realizada (FERREIRA-DIAS et al., 2019; XU; KRISTENSEN; ZHANG, 2007).

Nesse contexto, se faz necessário o estudo e otimização de processos que envolvam a síntese e aplicação de lipases. Fungos como *Aspergillus oryzae* são marcados por suas características morfológicas complexas em culturas submersas, que por sua vez afetam o rendimento do processo e a transferência de massa e agitação no biorreator. Dessa forma, para se conseguir a morfologia desejada para se

trabalhar em um determinado processo, é importante avaliar os fatores que a afetam, que dependem da cepa utilizada, condições de cultivo e composição do meio (ENSHASY, 2022). Sendo assim, este trabalho tem como objetivo fornecer uma maior compreensão sobre a produção de lipases de *Aspergillus oryzae*, contribuindo para o avanço da pesquisa nesta área e possibilitando aplicações práticas na indústria ao se avaliar características morfológicas e operacionais.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do projeto foi sintetizar e caracterizar lipase de *Aspergillus oryzae*, avaliando características morfológicas e operacionais.

2.2 Objetivos específicos

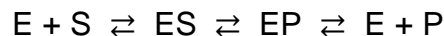
- Selecionar linhagens mais produtivas de *Aspergillus oryzae*, avaliando a suas características morfológicas;
- Estudar o pH e tempo de cultivo adequados para a síntese de lipase;
- Estudar a composição de meios de cultivo, em relação a fontes de carbono e nitrogênio para a síntese de lipase;
- Caracterizar a lipase quanto a seu pH e temperatura ótimos.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Enzimas

As enzimas são proteínas que agem como catalisadores de reações envolvidas na degradação de moléculas, acelerando essas reações através de sua alta especificidade ao substrato em que atua. Dessa forma, são chamadas de biocatalisadores, e sua atividade catalítica depende da integridade de sua conformação nativa, ou seja, se suas estruturas primária, secundária, terciária e quaternária forem desnaturadas ou degradadas sua atividade é perdida (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018; NELSON; COX, 2019).

Enzimas agem fornecendo um ambiente adequado para que uma determinada reação possa ocorrer de maneira mais rápida. Com isso, as reações enzimáticas acontecem confinadas no chamado sítio ativo da enzima, onde o substrato se liga de forma a permitir que a enzima aja sobre ele. O sítio ativo engloba o substrato e forma o complexo enzima-substrato, havendo então a conversão do substrato em produto, que é posteriormente liberado ao meio (CABRAL; AIRES-BARROS; GAMA, 2003; NELSON; COX, 2019). Uma reação enzimática pode ser descrita da seguinte forma:



onde E, S e P representam enzima, substrato e produto, e ES e EP os complexos enzima-substrato e enzima-produto, respectivamente (NELSON; COX, 2019).

Muitas enzimas são chamadas por seus nomes triviais, como lipase, hexocinase, urease, tripsina, entre outras. A fim de evitar ambiguidades e devido ao grande número de enzimas sendo descobertas, foi criado um sistema internacional de nomenclatura e classificação das mesmas, utilizando os números EC (do inglês *Enzyme Commission Numbers*). Esse sistema divide as enzimas de acordo com a reação que catalisam, através de seis classes numeradas (oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases) com suas respectivas subclasses. Assim, cada enzima possui uma classificação de 4 dígitos, além de um nome sistemático (NELSON; COX, 2019).

As enzimas possuem aplicação em diversas áreas. No setor industrial são largamente empregadas em indústrias de fármacos, alimentos, bebidas, detergentes, biocombustíveis e papel (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018; RIGO et al., 2021). A tabela 1 mostra as enzimas que são aplicadas em diversos setores e processos industriais.

Tabela 1 - Exemplos de aplicações industriais de diversas enzimas em seus respectivos setores

Setor	Enzimas	Aplicações
Farmacêutico	Transaminase, lipase, penicilina acilase	Síntese de intermediários para a produção de ingredientes ativos de fármacos
Alimentício	Tripsina, papaína, pectinase	Produção de prebióticos, conversão de amido a glicose, produção de aditivos de ração animal

Detergente	Protease, lipase, amilase	Remoção de manchas, retenção de cor, tratamento de resíduos
Bicombustível	Xilanase, lipase, celulase	Produção de ésteres metílicos de ácidos graxos, decomposição de material lignocelulósico
Papel e celulose	Lipase, celulase, xilanase	Remoção de lignina

Fonte: Adaptado de Chapman, Ismail e Dinu (2018) e Moo-Young (2011).

De acordo com o relatório da Business Communication Company (BCC) Research, o mercado global de enzimas para aplicação industrial deverá crescer de 6,4 bilhões em 2021 para 8,7 bilhões em 2026, com taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 6,3% durante esse período (BCC RESEARCH, 2021).

As principais vantagens na utilização industrial de enzimas são a redução dos custos de operação (quando utilizadas de forma eficiente), menores requisitos de energia, mitigação da geração de resíduos e rotas de produção simplificadas (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018). Ademais, quando comparadas a catalisadores químicos, as enzimas permitem que o processo seja realizado em condições mais brandas, com menos formação de subprodutos, maior seletividade e especificidade e menor toxicidade (LÓPEZ-FERNÁNDEZ; BENAIGES; VALERO, 2020).

Entretanto, a utilização de enzimas na indústria é limitada devido a sua baixa estabilidade em altas temperaturas e em regimes com alta agitação, devido ao cisalhamento. Sendo assim, é importante a realização de estudos focados em identificar e produzir enzimas mais robustas e estáveis, de forma que possam ser aplicadas em diferentes configurações (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018).

Todas as enzimas possuem uma temperatura e pH ótimos de atuação, na qual a atividade enzimática é máxima. Conforme ocorre o aumento da temperatura ocorre também o aumento da velocidade da reação, uma vez que se aumenta a energia cinética das moléculas. Entretanto, quando se atinge a temperatura ideal, um pequeno aumento desse valor pode levar à desnaturação da enzima, ou seja, à perda de sua estrutura nativa, e, conseqüentemente, causar a perda de sua atividade catalítica (BORZANI et al., 2001).

No caso do pH, pequenas alterações em relação ao valor ótimo também levam a diminuição da atividade. Isso porque as cadeias laterais dos aminoácidos do sítio ativo da enzima agem como ácidos fracos ou bases fracas se mantiverem certo grau de ionização. Em demais regiões da proteína, a remoção de um próton de um

determinado resíduo de aminoácido pode causar a extinção de uma interação iônica importante para a conformação ativa da enzima (BORZANI et al., 2001; GRAHAME; BRYKSA; YADA, 2015; NELSON; COX, 2019).

3.2 Lipases

Dentre as principais enzimas utilizadas industrialmente encontram-se as lipases (triacilglicerol acil hidrolase, E.C. 3.1.1.3), que catalisam a hidrólise e síntese de ésteres a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (UGO et al., 2017). Lipases não específicas catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol, com mono e diglicerídeos como intermediários, podendo atuar sobre todos os ácidos graxos de qualquer posição no substrato. Já lipases 1,3 específicas hidrolisam os acilgliceróis presentes nas posições sn-1 e sn-3 dos triacilgliceróis produzindo ácidos graxos livres, 2-monoacilgliceróis e 1,2-ou 2,3-diacilgliceróis, sem gerar glicerol (LÓPEZ-FERNÁNDEZ; BENAIGES; VALERO, 2020).

A hidrólise de gorduras, produzindo os ácidos graxos correspondentes, além de glicerol ou álcool, é catalisada pelas lipases em meio aquoso. Já em meio não aquoso, devido ao princípio de micro reversibilidade, as lipases também podem realizar reações de síntese, sendo elas a esterificação, que consiste na síntese de éster através da reação entre álcool e ácido carboxílico; e a transesterificação, que consiste na troca de um grupo acil de um éster com um grupo alquil de um álcool (alcoólise), ácido (acidólise) ou outro éster (interesterificação) (LÓPEZ-FERNÁNDEZ; BENAIGES; VALERO, 2020).

As lipases são extremamente versáteis, sendo ativadas apenas quando adsorvidas a uma interface óleo-água. Possuem aplicação nas indústrias de detergentes, biossurfactantes, agroquímica, papel, cosméticos, farmacêuticos, leite, alimentos, bebidas, ração animal, produtos de limpeza, biocombustível, têxtil, perfumaria, biossensores e biorremediação (CHANDRA et al., 2020; GEOFFRY; ACHUR, 2018; LÓPEZ-FERNÁNDEZ; BENAIGES; VALERO, 2020; RIGO et al., 2021).

Na indústria de alimentos as lipases atuam na mudança de lipídios da farinha e melhoram a qualidade do pão, no realce do sabor de queijos e manteiga, na síntese de lipídios estruturados para alimentos infantis e na melhoria da digestibilidade de lipídios naturais. Na indústria têxtil atuam na remoção de lubrificantes no tecido e na

melhora do processo de tingimento. Na produção de biodiesel permitem a utilização de óleos de diferentes fontes para a síntese, facilidade de separação e purificação e produção de glicerol de alta qualidade, além de não gerar subprodutos indesejados (MEHTA; BODH; GUPTA, 2017; RIGO et al., 2021). Devido a esta vasta aplicação e a grande necessidade da utilização de lipases na indústria, a lipase é o terceiro maior grupo de enzimas (considerando seu valor de mercado), atrás apenas das proteases e carboidrases (RIGO et al., 2021).

As lipases podem ser obtidas de plantas, animais, insetos e microrganismos (leveduras, bactérias e fungos). As de origem microbiana se destacam devido às suas vantagens em relação a lipases de outras fontes, como maior estabilidade, quimio e enantiosseletividade, ausência de requisitos de cofator, habilidade de operar em temperatura e pH extremos, grande rendimento, facilidade de manipulação genética, crescimento, baixa toxicidade, sustentabilidade, baixa demanda de energia, melhor eficiência e produtos de melhor qualidade (DABA; MOSTAFA; ELKHATEEB, 2021; GEOFFRY; ACHUR, 2018; LÓPEZ-FERNÁNDEZ; BENAIGES; VALERO, 2020; RIGO et al., 2021).

3.2.1 Fungos produtores de lipase

A maior parte das lipases microbianas são obtidas de fungos, como a lipase de *Rhizopus arrhizus*, utilizada na produção de ésteres para conferir aromas e sabor a alimentos e a lipase de *Aspergillus oryzae*, utilizada na hidrólise de óleos de resíduos agroindustriais (CHANDRA et al., 2020; RIGO et al., 2021).

Os fungos, especificamente os filamentosos, são ótimos produtores de lipase extracelular, com processos de extração e purificação relativamente simples. São capazes de produzir lipase de forma mais intensa e diversificada quanto a suas propriedades enzimáticas, estabilidade e especificidade ao substrato, aspectos importantes para sua aplicação industrial (GEOFFRY; ACHUR, 2018; RIGO et al., 2021; YU; XU; XIAO, 2016).

Os fungos filamentosos mais aplicados industrialmente são os dos gêneros *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.* e *Mucor sp.* (LÓPEZ-FERNÁNDEZ; BENAIGES; VALERO, 2020; RIGO et al., 2021), e sabe-se que as lipases produzidas por esses microrganismos são mais favoráveis devido a forma de

crescimento com hifas e sua tolerância à baixa atividade de água e a alta pressão osmótica (DABA; MOSTAFA; ELKHATEEB, 2021).

Grande parte do interesse em fungos produtores de lipase se deve à grande possibilidade da variação de seu meio de crescimento, bem como da capacidade de sintetizar lipases produtoras de ácidos graxos com valor agregado ao utilizar diversas fontes de carbono (RIGO et al., 2021). Ainda, de acordo com estudos, a atividade de lipases fúngicas varia dependendo das reações envolvidas em sua síntese, sendo importante ter como estratégia uma catálise específica a fim de se obter lipases com a atividade desejada, com mais eficiência e rendimento no processo (GEOFFRY; ACHUR, 2018).

Com isso em vista, houveram diversos avanços no trabalho com lipases de fungos, porém, ainda são necessários mais estudos para se selecionar linhagens fúngicas que produzam lipase com as características necessárias para aplicação em processos industriais. Assim, é necessário mais conhecimento de composição de meio de cultura, uma vez que ele afeta o crescimento e produção, bem como o estudo de processos mais viáveis economicamente (GEOFFRY; ACHUR, 2018).

3.2.1.1 *Aspergillus oryzae*

O *Aspergillus oryzae* é um fungo multicelular aeróbio, sendo uma das espécies mais importantes na área biotecnológica, com aplicações na área alimentícia, industrial, veterinária e farmacêutica. É muito utilizado na indústria alimentícia na produção de alimentos fermentados (missô, shoyu, tane-koji, vinagre, etc) e bebidas alcoólicas, sendo capaz de produzir altas concentrações de proteínas no meio de cultura. É considerado seguro (GRAS, do inglês *Generally Recognized as Safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo capaz de produzir amilase, lipase, celulase, pectinase, entre outros. É encontrado principalmente na Ásia e pode ser isolado do solo e de plantas em regiões subtropicais (DABA; MOSTAFA; ELKHATEEB, 2021; GOMI, 2014).

O *A. oryzae* pertence ao grupo *Aspergillus flavus-oryzae* e suas espécies podem ser diferenciadas de acordo com a forma de seus conídios. Este fungo cresce em diferentes meios, principalmente no PDA (*Potato Dextrose Agar*), de forma rápida e volumosa, e tem crescimento ótimo na temperatura de 32-36°C (não cresce acima de 44°C) e pH 5-6 (germina em pH 2-8) (DABA; MOSTAFA; ELKHATEEB, 2021).

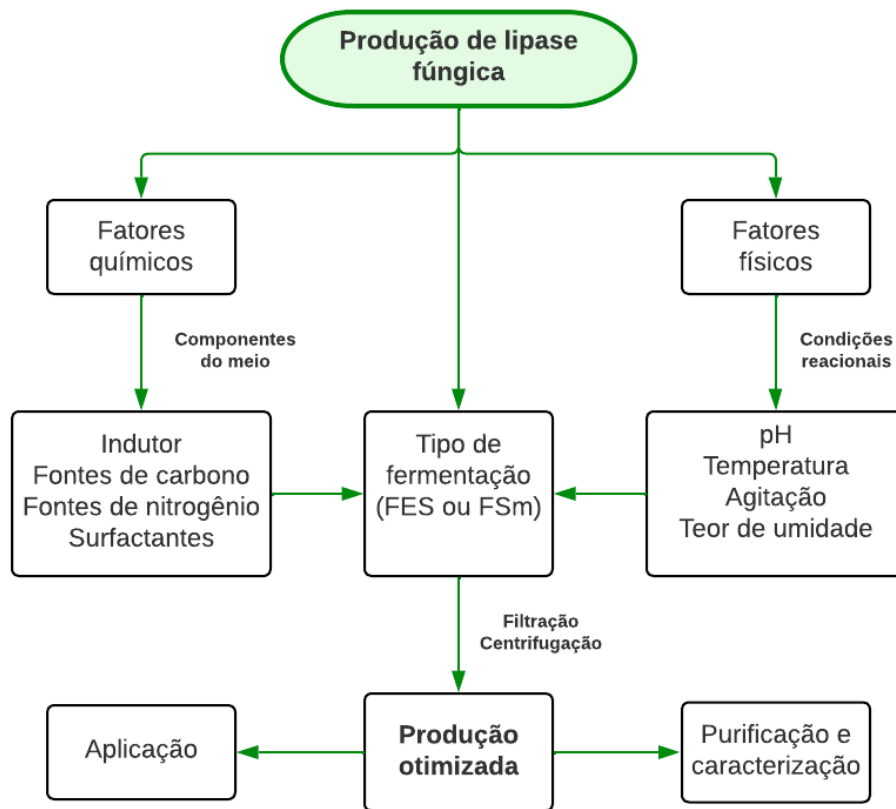
Inicialmente, esse microrganismo cresce na superfície do ágar com colônias de coloração branca por conta do crescimento vegetativo das hifas, e então se torna amarelo-esverdeado conforme a formação dos conídios (GOMI, 2014). No microscópio, possui vesícula globosa com cadeias de conídios alongadas, que se assemelham a filamentos brancos e fofos. Seus conidióforos são longos, originando-se do substrato, com paredes rugosas, cabeça conidial grande e radiada com conídios globosos (DABA; MOSTAFA; ELKHATEEB, 2021).

O *A. oryzae* produz diversas enzimas extracelulares que degradam carboidratos, polipeptídeos e ácidos nucleicos, como glucoamilases, celulases e proteases, utilizadas no processamento de amido, panificação, produção de detergentes e fabricação de cerveja (CHANG et al., 2014). As lipases produzidas por este fungo são geralmente aplicadas em produtos alimentícios para melhorar o sabor e aroma de queijos, iogurte, leite e manteiga; bem como na produção de produtos lácteos, óleos e gorduras, detergentes, cosméticos e medicamentos (DABA; MOSTAFA; ELKHATEEB, 2021).

3.3 Variáveis e condições que afetam a síntese e atividade da lipase

Reações catalisadas por lipases são influenciadas por diversos fatores, sendo eles químicos, físicos e biológicos. Os fatores considerados mais relevantes são a presença de um indutor (óleo como fonte de carbono), fontes de nitrogênio e carbono, cepa utilizada, método de cultivo e parâmetros fisiológicos adequados, como temperatura, pH, nível de oxigênio e agitação (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; GEOFFRY; ACHUR, 2018; RIGO et al., 2021). A figura 1 representa os principais fatores que influenciam a produção de lipase.

Figura 1 - Esquema dos principais fatores que influenciam a síntese de lipase por fungos



Fonte: Adaptado de Geoffry e Achur (2018).

Dessa forma, é importante estudar a influência desses parâmetros na produção de lipase por fungos, de forma a se obter maior rendimento e eficácia (GEOFFRY; ACHUR, 2018).

3.3.1 Temperatura e pH

A temperatura e o pH são fatores essenciais para a produção de enzimas microbianas. No caso da temperatura, a saturação ótima do sítio ativo da enzima ocorre na temperatura ótima, e uma pequena variação nesse nível afeta negativamente o rendimento. Temperaturas mais altas que a ideal aumentam a velocidade de morte celular, enquanto temperaturas mais baixas diminuem a velocidade do microrganismo e de produção da enzima (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; GEOFFRY; ACHUR, 2018; GRAHAME; BRYKSA; YADA, 2015).

Cada microrganismo também atua em uma faixa específica de pH. Desvios em relação ao pH ideal afetam negativamente a atividade catalítica da enzima produzida, devido a desnaturação, inativação ou rompimento celular. Muitos microrganismos possuem faixas ótimas diferentes para seu crescimento e para a fermentação, fazendo com que diversos processos fermentativos sejam monitorados e controlados de forma a otimizar a obtenção do produto final. Nesses casos, se o meio não for devidamente ajustado, o crescimento pode ser inibido devida a variação do pH (GEOFFRY; ACHUR, 2018; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Ainda, a alteração do pH do meio de cultivo pode ser minimizada através da utilização de agentes tamponantes, como fosfatos e carbonatos, que agem liberando ou combinando-se a íons hidrogênio no meio quando sua concentração se altera. Compostos muito utilizados em meios de cultura, como peptona e aminoácidos, além de serem fatores nutricionais, também possuem capacidade tamponante (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

3.3.2 Indutor

O fator de maior influência na produção de lipase de fungos é a utilização de óleo no meio de produção, uma vez que a enzima é produzida através da indução de genes produtores de lipase. Nesse sentido, além de ser uma fonte de carbono, o óleo atua também como indutor na produção. Nos principais estudos realizados, a secreção da lipase é induzida principalmente pelo azeite de oliva, triacilgliceróis, Tweens, óleo de palma, óleo de milho e óleo de coco (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; GEOFFRY; ACHUR, 2018).

Trabalhos mostram que o óleo como indutor é indispensável na produção de lipase por fungos, e seus efeitos variam de acordo com o microrganismo e o tipo de óleo utilizado, devido às diferentes composições de ácidos graxos. Nesse aspecto, os fungos têm preferência por ácidos graxos saturados para a produção de lipase. O azeite de oliva apresenta os melhores resultados quanto a atividade da lipase quando comparado a outros óleos, devido à alta quantidade de ácido oleico em sua composição (GEOFFRY; ACHUR, 2018).

3.3.3 Fontes de carbono e nitrogênio

Além da utilização do óleo, muitos trabalhos utilizam também açúcares como fonte de carbono, como glicose, lactose, sacarose, glicerol e xilose, visando melhorar o crescimento do microrganismo e maximizar a produção (AYINLA; ADEMAKINWA; AGBOOLA, 2017; DALMAU et al., 2000; ALMEIDA; TAULK-TORNISIELO; CARMONA, 2012). Entretanto, esses açúcares fermentáveis podem levar à repressão da produção de lipase devido a sua capacidade de acidificar o meio de cultivo (GEOFFRY; ACHUR, 2018).

A fonte de nitrogênio também é essencial para o crescimento do micélio e da atividade da lipase. O tipo de fonte de nitrogênio adicionado ao meio determina o nível de produção de lipase, sendo diferente para cada cepa. Diversos estudos mostraram a importância de fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas para a produção de lipase por fungos, porém, alguns mostraram que a atividade da lipase produzida é maior utilizando fontes orgânicas. As principais fontes (orgânicas e inorgânicas) são sais de amônio, extrato de levedura, nitrato de sódio, ureia, peptona e triptona (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; GEOFFRY; ACHUR, 2018).

3.3.4 Tipo de cultivo

Outro ponto importante na síntese de lipase é o tipo de cultivo empregado, que pode ser a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FSm). A fermentação em estado sólido consiste no cultivo utilizando substratos insolúveis sólidos, contendo pouca atividade de água. É um método muito utilizado, sendo simples, com baixo nível de repressão catabólica, baixo desperdício de água, melhor recuperação e alta qualidade do produto final, sendo (GEOFFRY; ACHUR, 2018; RIGO et al., 2021).

Já a fermentação submersa consiste no cultivo com o meio na forma líquida, proporcionando maior homogeneidade, melhor distribuição do inóculo e maior facilidade no controle das variáveis como temperatura e pH, permitindo melhor transferência de massa e calor e melhor absorção de nutrientes. Além disso, a recuperação e purificação de enzimas extracelulares e a determinação da biomassa são mais fáceis, sendo possíveis através da filtração e centrifugação. Entretanto, a transferência de oxigênio é mais difícil em meio líquido (GEOFFRY; ACHUR, 2018; BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; LIMA, 2019).

3.4.5 Tempo de cultivo

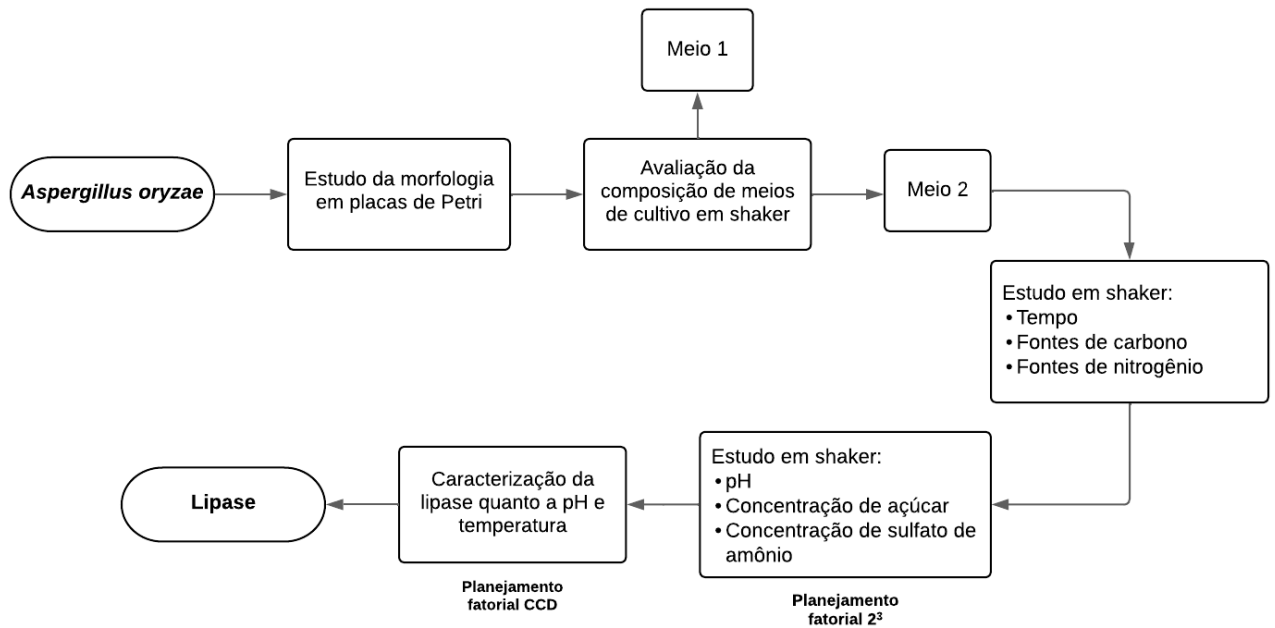
O tempo de cultivo é uma variável que afeta significativamente a síntese, pois a quantidade de lipases produzidas pode aumentar ou diminuir dependendo da duração da produção. De forma geral, no início do cultivo a produção de enzimas é baixa, e aumenta gradativamente conforme os nutrientes são consumidos pelo microrganismo e condições ótimas são alcançadas. Entretanto, se o cultivo se estende por muito tempo, a produção de enzimas tende a diminuir por conta da escassez de nutrientes e pelo aumento da concentração de subprodutos no meio, que podem atrapalhar a produção e/ou degradar a lipase (MAFTUKHAH; ABDULLAH, 2018; SEGUINOT; ORTIZ-JULIEN; CAMARASA, 2020).

Conseqüentemente, torna-se evidente que monitorar o tempo e investigar demais condições que afetam o cultivo são cruciais para maximizar a produção de lipases por fungos. Esse objetivo pode ser alcançado através de experimentos voltados para a otimização dos parâmetros mencionados.

4 Materiais e métodos

A figura 2 mostra um fluxograma com um resumo das etapas realizadas neste trabalho, a fim de produzir e estudar a lipase de *Aspergillus oryzae*.

Figura 2 - Fluxograma da produção e estudo da lipase de *Aspergillus oryzae*.



Fonte: Autora (2023).

4.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentososo de *Aspergillus oryzae*, que inicialmente foi repicado e cultivado em placas de Petri com meio PDA (ágar batata dextrose) a 30°C por 4 dias, e repicado a cada 2 meses visando manter a viabilidade celular. Após repicado, as placas foram estocadas em geladeira 4°C.

4.2 Estudo de morfologia e seleção de linhagens mais produtivas do fungo

A propagação de esporos e o estudo de morfologia do *A. oryzae* foi realizada através do cultivo em placas de Petri com meio de cultura sólido PDA e Sabouraud, através da técnica de esgotamento. Após inoculadas, as placas foram incubadas a 30°C por 5 dias.

Posteriormente, a fim de isolar uma colônia do *A. oryzae* em meio PDA, foi feito novamente seu cultivo em placas de Petri através de uma diluição seriada, inoculando o fungo até se atingir concentrações celulares de 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Após inoculadas, as placas foram incubadas a 30°C por 4 dias.

Então, fez-se novamente um cultivo na concentração celular de 10^{-8} em placas de Petri com meio PDA, que foram incubadas a 30°C por 5 dias.

4.3 Avaliação da composição de meios de cultivo para cultivo submerso

Para todos os ensaios preliminares de produção (descritos nos itens 4.3.1 e 4.3.2 a seguir), o *A. oryzae* foi cultivado em um tubo inclinado por 5 dias a 30°C (a partir das colônias obtidas pelo cultivo na diluição de 10^{-8} em placas de Petri), e então ressuscitado utilizando 10 mL de solução salina (0,9% de NaCl). Com auxílio de um tubo Falcon, 5 mL dessa ressuspensão foram adicionados ao chamado pré-inóculo (com a mesma composição do meio de produção), a fim de obter o inóculo para a produção da lipase.

4.3.1 Ensaio preliminar 1

O primeiro ensaio preliminar para produção de lipase foi realizado utilizando o meio 1, descrito por Adham e Ahmed (2009), composto por: 3% de peptona, 0,05% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05% de KCl, 0,2% de $K_2H_2PO_4$ e 1% de azeite de oliva:glucose (0,5:0,5).

Inicialmente, em Erlenmeyers de 500 mL, foi feito um pré-inóculo e meios de produção em triplicata, todos contendo 45 mL de meio. O pré-inóculo foi inoculado com o fungo ressuscitado e incubado em shaker a 200 rpm e 30°C por 48h. Após as 48h, foi adicionado 5 mL do pré-inóculo nos meios de produção, que foram então colocados em shaker a 200 rpm e 30°C por 96h.

4.3.2 Ensaio preliminar 2

O segundo ensaio preliminar para produção de lipase foi feito com o meio 2, adaptado do meio descrito por Ayinla, Ademakinwa e Agboola (2017): 0,3% de peptona, 1% de extrato de levedura, 0,1% de goma arábica, 0,05% de NaCl, 0,05% de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1% de azeite de oliva e 1% de sacarose em pH 5. Assim como no ensaio preliminar 1, o pré-inóculo foi inoculado com o fungo ressuscitado e incubado em shaker a 150 rpm e 37°C por 48h. Após, 5 mL do pré-inóculo foi adicionado aos meios de produção em triplicata, que foram então colocados em shaker a 150 rpm e 37°C por 96h.

4.4 Avaliação de parâmetros para a produção de lipase

4.4.1 Avaliação do efeito do tempo de cultivo

A fim de avaliar o melhor tempo de produção da lipase de *Aspergillus oryzae*, foi realizado um cultivo em triplicata com o meio do ensaio preliminar 2, alterando a agitação para 200 rpm a 37°C. Foram avaliadas amostras nos tempos de 96h e 120h.

4.4.2 Avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio

Para avaliar as melhores fontes de carbono e nitrogênio para a produção de lipase, foram realizados cultivos com o meio do ensaio preliminar 2, alterando a fonte de carbono entre glicose e xilose. Ainda, foi realizado um cultivo mantendo a sacarose e substituindo a peptona por sulfato de amônio. Todos os cultivos foram realizados com agitação de 200 rpm a 37°C, com amostras em 120h e 144h em triplicata.

4.4.3 Avaliação do efeito do pH, da concentração de açúcar e da concentração de sulfato de amônio

A fim de determinar o efeito do pH, da concentração de açúcar e de sulfato de amônio para a síntese de lipase, bem como o efeito da interação dessas variáveis, foi realizado um delineamento composto central (DCC) 2³ (3 fatores avaliados em 2 níveis) com 3 pontos centrais, conforme a tabela 2.

As variáveis independentes foram o pH, a concentração de açúcar e a concentração de sulfato de amônio, enquanto a variável dependente (resposta) foi a atividade hidrolítica da lipase obtida.

Tabela 2 - Faixa e níveis das variáveis do DCC 2³ com 3 pontos centrais

Variável	Níveis		
	-1	0	1
pH	4	5	6
Concentração de sacarose (g/L)	6	10	14
Concentração de sulfato de amônio (g/L)	1,5	3	4,5

Fonte: Autora (2023).

A síntese foi realizada utilizando o meio composto por 1% de extrato de levedura, 0,1% de goma arábica, 0,05% de NaCl, 0,05% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 1% de azeite de oliva, e variando a concentração de sacarose e sulfato de amônio e pH, nas condições de 200 rpm a 37°C por 120h.

4.5 Caracterização da lipase

A fim de caracterizar a lipase quanto ao pH e temperatura ideais quanto á atividade hidrolítica, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) de 2 fatores com 3 pontos centrais, conforme a tabela 3

As variáveis independentes foram o pH e a temperatura, enquanto a variável dependente (resposta) foi a atividade hidrolítica da lipase obtida.

Tabela 3 - Faixa e níveis das variáveis do DCCR de 2 fatores com 3 pontos centrais

Variável	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
pH	3,885	4,5	6	7,5	8,115
Temperatura (°C)	25,9	30	40	50	54,1

Fonte: Autora (2023).

A lipase foi obtida utilizando o meio composto por 0,45% de sulfato de amônio, 1% de extrato de levedura, 0,1% de goma arábica, 0,05% de NaCl, 0,05% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1% de azeite de oliva e 1,4% de sacarose em pH 6, nas condições de 200 rpm a 37°C por 120h.

4.6 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica foi determinada pelo método de emulsão de azeite (SOARES et al., 1999). A emulsão foi preparada utilizando a proporção de 15 g de azeite de oliva, 15 g de água, 2,1 g de goma arábica e 24 mL de tampão fosfato

0,1 mol/L pH 7.0. A solução enzimática foi obtida pela centrifugação do meio a 10000 rpm por 10 min, a fim de separar as células do fungo.

Em um erlenmeyer foram adicionados 9 mL da emulsão, e em seguida colocado em banho termostático a 150 rpm a 37°C por 5 min. Após, foram adicionados 1 mL de solução enzimática à reação, seguindo-se de banho termostático a 150 rpm a 37°C por 5 min.

A reação foi parada adicionando 10 mL de solução água:acetona:álcool (1:1:1, v/v/v) e foram adicionadas 3 gotas de fenolftaleína e hidróxido de potássio 0,05 M em excesso, sendo então feita a titulação com ácido clorídrico 0,05 M padronizado. O cálculo de atividade hidrolítica foi feito de acordo com a equação 1:

$$A = \frac{(V_b - V_a)M1000}{tv} \text{ equação 1}$$

Onde:

A: atividade hidrolítica (U/mL)

V_b : volume de ácido clorídrico gasto na titulação do branco (mL)

V_a : volume de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra (mL)

M: molaridade do titulante (mol/L)

t: tempo da reação (5 min);

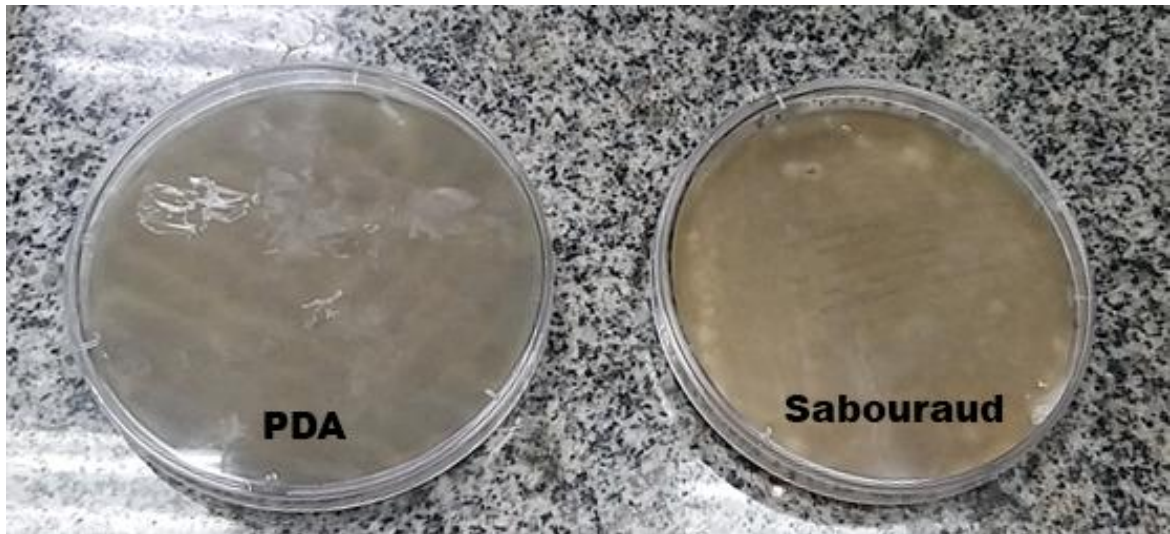
v: volume de enzima (mL)

5 Resultados e discussão

5.1 Estudo de morfologia

Inicialmente, a morfologia do *Aspergillus oryzae* foi avaliada através de seu cultivo em placas de Petri com os meios de cultura PDA e Sabouraud. Após 5 dias de cultivo, o fungo cresceu sobre a superfície do ágar e adquiriu um tom amarelo-esverdeado, que pode ser observado na figura 3.

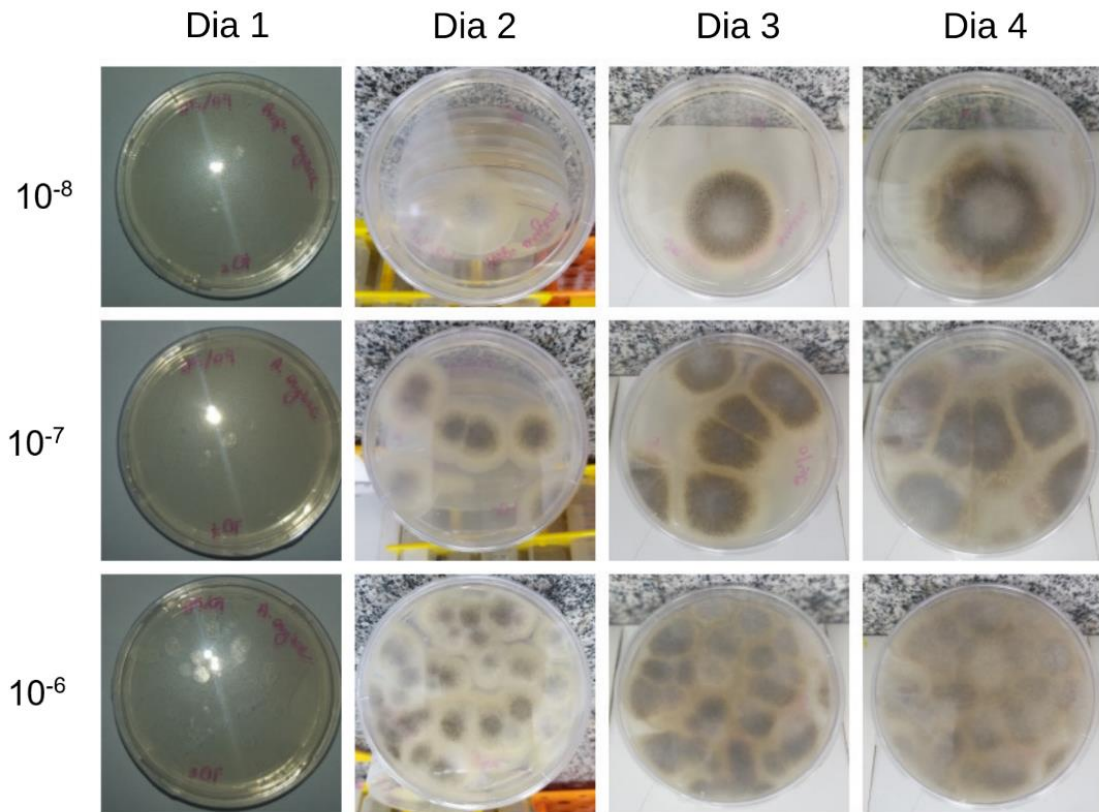
Figura 3 - Cultivo do *Aspergillus oryzae* em placas de Petri com meio PDA e Sabouraud após 5 dias



Fonte: Autora (2023).

A partir das colônias obtidas, novos cultivos em placas de Petri foram realizados com meio PDA, uma vez que proporcionou bom crescimento do fungo e é um dos mais utilizados para o *A. oryzae*, conforme Daba, Mostafa e Elkhateeb (2021). Esses novos cultivos tiveram por objetivo isolar uma colônia do fungo e avaliar suas diferenças morfológicas, e foram acompanhados diariamente por 4 dias. Na figura 4 é possível observar as colônias formadas pelo fungo ao ser cultivado nas concentrações de 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} .

Figura 4 - Cultivo de colônias de *Aspergillus oryzae* em placa de Petri com meio PDA nas concentrações de 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} ao longo de 4 dias



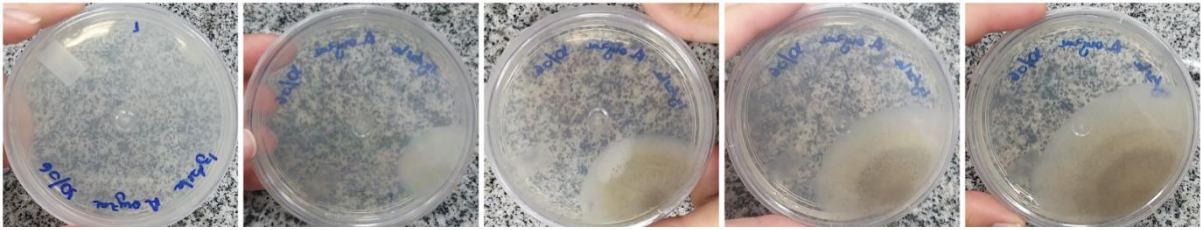
Fonte: Autora (2023).

Nota-se que a velocidade de crescimento das colônias foi similar em todas as concentrações, diferindo no tamanho por conta da área livre de crescimento em cada uma. Na concentração de 10^{-6} o fungo formou colônias de formato mais circular, enquanto na concentração de 10^{-7} formou colônias de formato mais oval e irregular.

Já na concentração de 10^{-8} foi possível isolar uma única colônia, que cresceu com a região central mais clara quando comparada as demais concentrações, com formato circular e borda mais irregular no quinto dia. Dessa forma, essa concentração proporcionou um crescimento de colônia isolado e com hifas aéreas maiores.

Na figura 5 é possível observar um novo cultivo na concentração de 10^{-8} , e notar que inicialmente o fungo cresce sobre o ágar com uma colônia de cor branca, e aos poucos vai ganhando coloração amarelo-esverdeada, assim como observado por Gomi (2014).

Figura 5 - Cultivo de uma colônia isolada de *Aspergillus oryzae* em placa de Petri com meio PDA, do dia 1 ao dia 5 (da esquerda para a direita)



Fonte: Autora (2023).

Ainda, na figura 6, é possível observar o fungo cultivado em tubo inclinado após 5 dias.

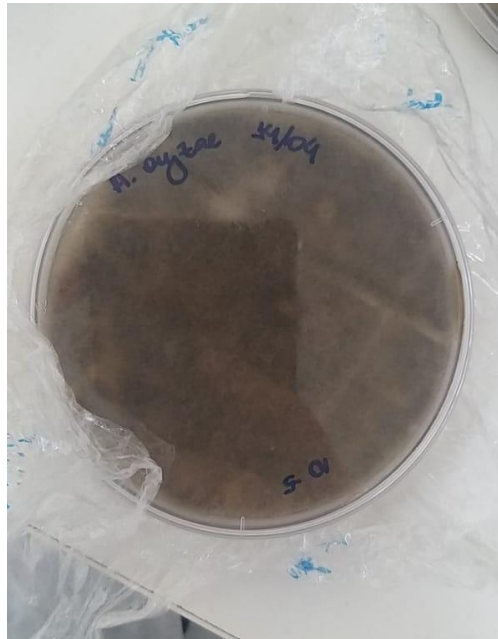
Figura 6 - Cultivo do *Aspergillus oryzae* em tubo inclinado após 5 dias



Fonte: Autora (2023).

Como analisado por Chang et al. (2014), colônias envelhecidas de *A. oryzae* adquirem uma coloração marrom, que pode ser observada na figura 7, que mostra o fungo cultivado em placa de Petri com PDA após 2 meses armazenado em geladeira a 4°C.

Figura 7 - Cultivo do *Aspergillus oryzae* em PDA após 2 meses armazenado a 4°C



Fonte: Autora (2023).

A partir desses cultivos, foi possível observar as características morfológicas do *A. oryzae* e compará-las com a literatura, e assim verificar que a cepa obtida estava viável para sua utilização na produção de lipase.

5.2 Avaliação da composição de meios de cultivo para cultivo submerso

O primeiro passo para a produção da lipase de *A. oryzae* foi a realização de ensaios preliminares de produção a partir de dois meios encontrados na literatura. Na tabela 4 é possível observar a atividade hidrolítica da lipase obtida por cada meio após 96h de produção.

Tabela 4 - Atividade hidrolítica da lipase de *Aspergillus oryzae* obtida por cada meio após 96h de cultivo

Meio	Atividade (U/mL)	Desvio Padrão
1	7,45	2,73
2	5,06	1,58

Fonte: Autora (2023).

Segundo Bharathi (2019) e Geoffry e Achur (2018), o óleo como fonte de carbono é um fator de grande influência na fermentação submersa, uma vez que os lipídios são responsáveis por induzir a produção de lipase. Ademais, de acordo com El-Ghonemy *et al.* (2020), azeite de oliva, glicose, peptona, extrato de levedura e sais são os compostos essenciais para a síntese da lipase de fungos como *Rhizopus arrhizus* e *Aspergillus niger*.

Pode-se dizer que ambos os resultados obtidos neste trabalho ($7,45 \pm 2,73$ U/mL para o meio 1 e $5,06 \pm 1,58$ para o meio 2) foram baixos, porém apresentaram potencial de aumento se feito um estudo dos parâmetros utilizados para se selecionar um meio de cultivo que melhor atenda o objetivo final.

A tabela 5 a seguir apresenta os resultados do teste ANOVA, realizado para avaliar se houve diferença significativa entre os resultados.

Tabela 5 - Resultados do teste ANOVA para comparação entre os meios de cultivo, com $\alpha=0.05$

	SQ	GL	QM	F	valor-p
Entre Grupos	8.5443	1	8.5443	2.7439	0.1730
Dentro de Grupos	12.4557	4	3.1139		
Total	20.9999	5			

Fonte: Autora (2023).

Como o valor-p é maior que 0.05, é possível concluir que não há diferença significativa entre as médias. Dessa forma, considerando que os resultados são estatisticamente iguais, escolheu-se o meio 2 como base para o estudo de sua composição e aprimoramento da produção de lipase de *Aspergillus oryzae*, uma vez que forneceu um resultado com menor desvio padrão.

Em seu trabalho, Adham e Ahmed (2009) produziram lipase com atividade de 325 U/mL utilizando uma cepa de *Aspergillus niger* NRRL3. Já Ayinla, Ademakinwa e Agboola (2018), obtiveram lipases de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus glaucus*, com atividade de 16,84 U/mL e 15,94 U/mL, respectivamente. Ma et al. (2021) obtiveram lipase de *Aspergillus niger* com atividade de 1,55 U/mL e Ilesanmi et al. (2020) obtiveram lipase de *Pseudomonas aeruginosa* com atividade de 0,528 U/mL.

A partir disso, nota-se que a atividade hidrolítica da lipase varia entre a literatura, mostrando que provavelmente pequenas alterações nos parâmetros do

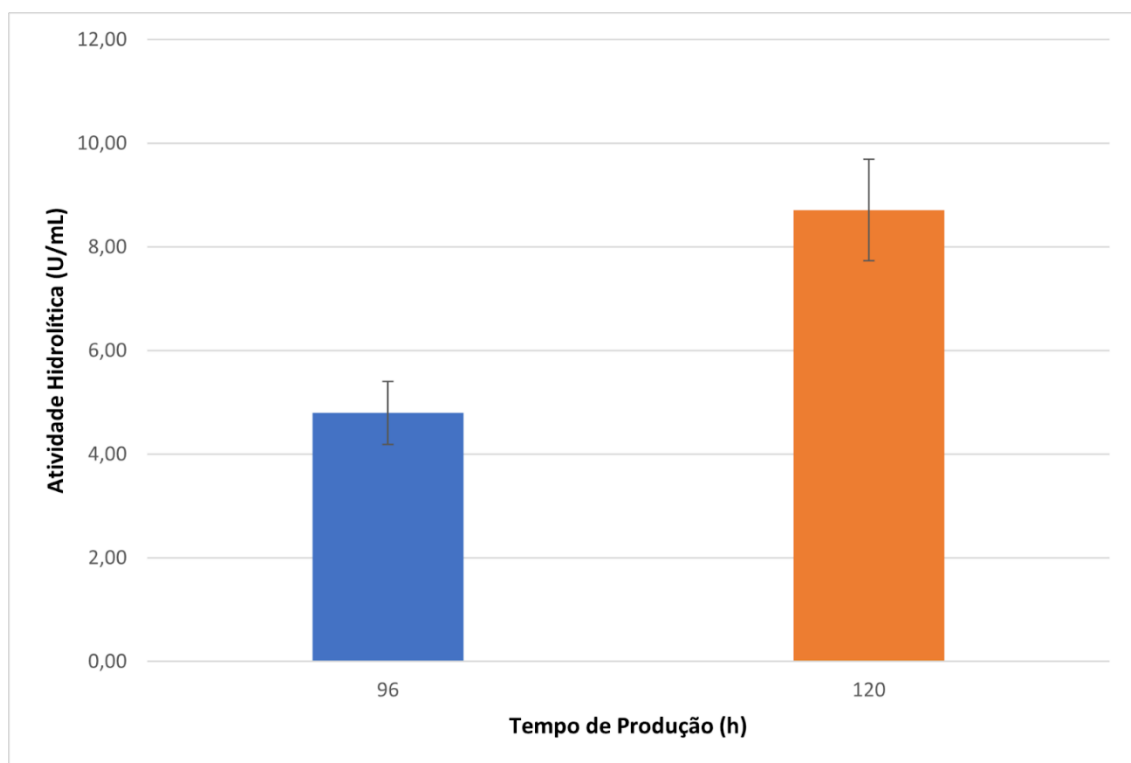
cultivo, do microrganismo utilizado e do método de medição da atividade são capazes de afetar significativamente a atividade da enzima.

5.3 Avaliação de parâmetros para a produção de lipase

5.3.1 Efeito do tempo de cultivo

O primeiro experimento para o aprimoramento da síntese de lipase consistiu na avaliação do tempo de produção de 96h e 120h. A figura 8 mostra o comparativo entre esses tempos de acordo com a atividade hidrolítica da lipase produzida pelo *A. oryzae*.

Figura 8 - Gráfico da atividade hidrolítica da lipase de *Aspergillus oryzae* após 96h e 120h de cultivo



Fonte: Autora (2023).

Nota-se que em 96h a lipase obtida teve atividade de $4,80 \pm 0,61$ U/mL, próxima da atividade obtida anteriormente nesse mesmo tempo ($5,06 \pm 1,58$ U/mL). Já após 120h a atividade aumentou para $8,71 \pm 0,98$ U/mL.

Em condições similares, a atividade máxima da lipase foi obtida em 96h por Ayinla, Ademakinwa e Agboola (2018) utilizando *Rhizopus oryzae*, Cihangir e Sarikaya

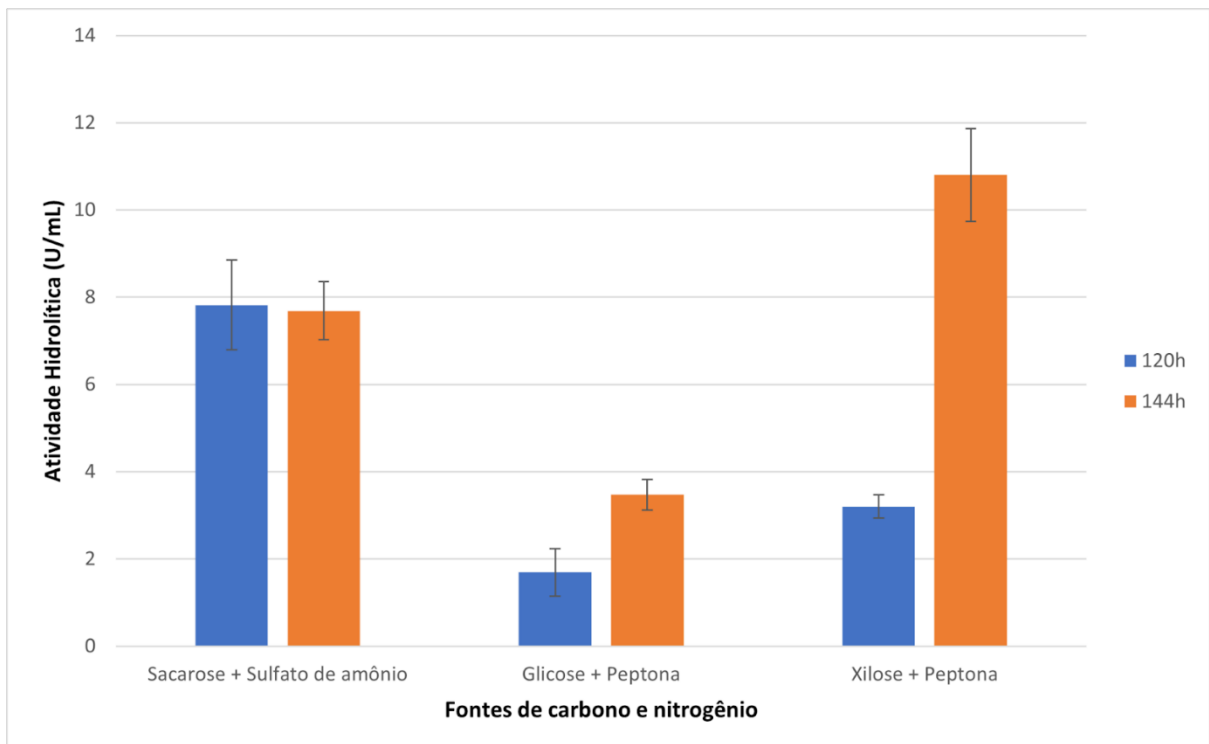
(2004) utilizando *Aspergillus sp.* e Amin et al. (2021a) utilizando *Aspergillus melleus*. Já Triyaswati e IImi (2020) obtiveram valores máximos de atividade da lipase de *Aspergillus aculeatus* em 120h; enquanto Alabdall et al. (2020) obtiveram atividade máxima em 72h utilizando *Aspergillus niger*.

Os diversos resultados de tempo de produção ótimos da lipase encontrados na literatura se justificam principalmente pelo fato de que diferentes fungos precisam de diferentes tempos de incubação para produção ótima de lipase (AYINLA; ADEMAKINWA; AGBOOLA, 2018). Porém, outros fatores relacionados ao tempo de incubação também afetam a produção e serão discutidos mais adiante.

5.3.2 Efeito das fontes de carbono e nitrogênio

Tendo em vista que em 120h foi obtido o maior valor de atividade da lipase de *A. oryzae*, o segundo experimento comparou os tempos de 120h e 144h, bem como diferentes fontes de carbono e nitrogênio. A figura 9 mostra as atividades hidrolíticas obtidas.

Figura 9 - Gráfico da atividade hidrolítica da lipase de *A. oryzae* após 120h e 144h de cultivo utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio



Fonte: Autora (2023).

Analisando-se a figura 8, pode-se observar que o meio com glicose forneceu os piores resultados de atividade nos dois tempos avaliados ($1,69 \pm 0,54$ U/mL e $3,47 \pm 0,35$ U/mL), enquanto os meios com xilose em 144h ($10,8$ U/mL $\pm 1,06$ U/mL) e sacarose em 120h e 144h ($7,82 \pm 1,03$ U/mL e $7,69 \pm 0,67$ U/mL, respectivamente) ofereceram os melhores. Segundo Burkert, Maugeri e Rodrigues (2004), a glicose é um monossacarídeo que pode aumentar o crescimento do fungo, porém pode reduzir a produção de lipase. Em concordância, El-Ghonemy et al. (2020) estabeleceram que a glicose pode causar repressão catabólica na atividade lipolítica, sendo conhecido esse efeito em fungos como *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizomucor miehei* e *Rhizopus delemar*. No trabalho de Lotti et al. (1998) e Dalmau et al. (2000) a glicose teve efeito inibidor no crescimento e na produção de lipase de *Candida rugosa*, e no de Niaz et al. (2013 apud GEOFFRY; ACHUR, 2018), a glicose teve efeito inibidor na síntese de lipase de *Aspergillus niger* 1207.

Como observado, o maior resultado de atividade foi para o meio contendo xilose e peptona em 144h. Entretanto, ambos os componentes são mais dispendiosos que os demais testados, ocasionando em um aumento de gastos do ponto de vista industrial. Dessa forma, os meios compostos por sacarose e sulfato de amônio em 120h e 144h foram vistos como melhores nesse contexto.

De forma geral, a demanda de açúcar como fonte de carbono varia dependendo do microrganismo e é de grande importância na produção de energia, sendo capaz de melhorar o cultivo e aumentar o metabolismo celular, e conseqüentemente aumentar a atividade enzimática (ALABDALALL et al., 2020; AYINLA; ADEMAKINWA; AGBOOLA, 2018). Fontes de carbono compostas por monossacarídeos possuem maior facilidade de assimilação por parte fungo (ALABDALALL et al., 2020; DUTTA et al., 2022), entretanto, foi visto que o meio com glicose apresentou baixa atividade, e supõe-se que esse açúcar acabou sendo preferencialmente utilizado pelo fungo em seu crescimento, em vez de ser usado como fonte de carbono para a produção de lipase. Ainda, a facilidade de assimilação da glicose pode ter ocasionado a inibição da produção. Já o meio com xilose, outro monossacarídeo, apresentou o melhor resultado, mas ao se observar fatores como o custo de reagentes e tempo de produção, esse resultado não se distanciou muito do meio com sacarose, que, como visto, foi considerado como o melhor.

A presença de uma fonte de nitrogênio também é muito importante para o metabolismo fúngico e para a produção de enzimas, devido a demanda por aminoácidos para síntese (JOSHUA, 2018). Comparando as fontes de nitrogênio utilizadas neste trabalho, o meio contendo sacarose e sulfato de amônio apresentou atividade de $7,82 \pm 1,03$ U/mL, resultado próximo do obtido anteriormente com sacarose e peptona ($8,71 \pm 0,98$ U/mL). Isso evidenciou a possibilidade de substituir a peptona pelo sulfato de amônio na produção de lipase, que é um reagente mais barato.

Esperava-se que fontes orgânicas oferecessem o melhor resultado (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; GEOFFRY; ACHUR, 2018), mas, como visto, o sulfato de amônio e a peptona proporcionaram resultados muito próximos quando combinados com sacarose. Além disso, todos os meios também continham extrato de levedura, mostrando que a combinação de sulfato de amônio com uma fonte orgânica foi favorável, conforme verificado por Sharma, Chisti e Banerjee (2001).

Ayinla, Ademakinwa e Agboola (2018) obtiveram o melhor resultado de atividade da lipase de *Rhizopus oryzae* utilizando xilose e sacarose como fontes de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Já Alabdall et al. (2020) atingiram seu melhor resultado utilizando frutose e extrato de levedura para *Aspergillus niger* na síntese da lipase; concluindo que as fontes de carboidrato foram as de maior importância no crescimento dos fungos e na atividade metabólica, e que a maior produção de lipase foi utilizando monossacarídeos. Lima et al. (2019), também utilizando *Aspergillus niger*, obtiveram o melhor resultado utilizando sulfato de amônio, extrato de levedura e sacarose como fontes de nitrogênio e carbono. Enquanto Dutta et al. (2022) e Shakil, Ahmed e Sohail (2019) alcançaram o melhor resultado utilizando meio com peptona e glicose para *Zygosaccharomyces mrakii* TS16 e *Cantharellus cibarius*, respectivamente.

Apesar de não se ter avaliado tempos maiores que 144h, sabe-se que a queda de atividade em um certo momento é esperada, possivelmente por conta da secreção de proteases pelo fungo, que podem inativar a lipase (DIAZ, 2006 apud AYINLA; ADEMAKINWA; AGBOOLA, 2018), bem como pelo esgotamento dos nutrientes do meio de cultura e síntese de outros subprodutos que podem inibir a produção ou desnaturar a enzima (SHARMA et al., 2016).

Dessa forma, considerando que a sacarose e o sulfato de amônio são significativamente mais baratos que xilose e peptona, esses componentes foram

fixados para os próximos experimentos. Nesse caso, a produção não se alterou significativamente entre 120h e 144h, sendo então definido o tempo de 120h como ideal, uma vez que um tempo de produção mais rápido resulta em maior produtividade e economia no processo.

5.3.3 Efeito do pH, concentração de açúcar e concentração de sulfato de amônio

A partir da composição do meio obtida através dos experimentos anteriores, foi então realizado um experimento, variando algumas condições de cultivo de modo a possibilitar uma análise fatorial dos resultados, para enfim determinar as melhores concentrações de sacarose, sulfato de amônio e de pH, bem como a interação entre esses componentes. As faixas estudadas foram escolhidas com base nos principais resultados observados na literatura (AYINLA; ADEMAKINWA; AGBOOLA, 2018; LIMA, 2019). Os resultados podem ser vistos na tabela 6.

Tabela 6 - Resultados de atividade hidrolítica da lipase de *Aspergillus oryzae* obtidos pelo DCC 2³ com 3 pontos centrais

Experimento	pH	Concentração de sacarose (g/L)	Concentração de sulfato de amônio (g/L)	Atividade Hidrolítica (U/mL)	Desvio Padrão
1	6 (1)	14 (1)	4,5 (1)	94,33	5,51
2	4 (-1)	14 (1)	4,5 (1)	36,67	3,51
3	6 (1)	14 (1)	1,5 (-1)	21,33	3,21
4	4 (-1)	14 (1)	1,5 (-1)	21,00	1,73
5	6 (1)	6 (-1)	4,5 (1)	40,33	2,52
6	4 (-1)	6 (-1)	4,5 (1)	34,33	4,93
7	6 (1)	6 (-1)	1,5 (-1)	11,33	1,53
8	4 (-1)	6 (-1)	1,5 (-1)	4,00	2,65
9	5 (0)	10 (0)	3,0 (0)	24,67	2,08
10	5 (0)	10 (0)	3,0 (0)	30,00	4,36
11	5 (0)	10 (0)	3,0 (0)	25,00	2,65

Fonte: Autora (2023).

A maior atividade hidrolítica ($94,33 \pm 5,51$ U/mL) foi observada no experimento 1, o qual foi conduzido utilizando meio com pH 6 e concentração de sacarose e de sulfato de amônio de 14 g/L e 4,5 g/L, respectivamente. Esse valor foi 16,8 vezes

maior que o valor inicial obtido ($5,06 \pm 1,58$ U/mL), evidenciando a influência da composição do meio na produção de lipase por *A. oryzae*.

A tabela 7 mostra um resumo do modelo estatístico utilizado para avaliar os dados, e nota-se que os resultados sugerem que o modelo de regressão foi um bom ajuste aos dados observados.

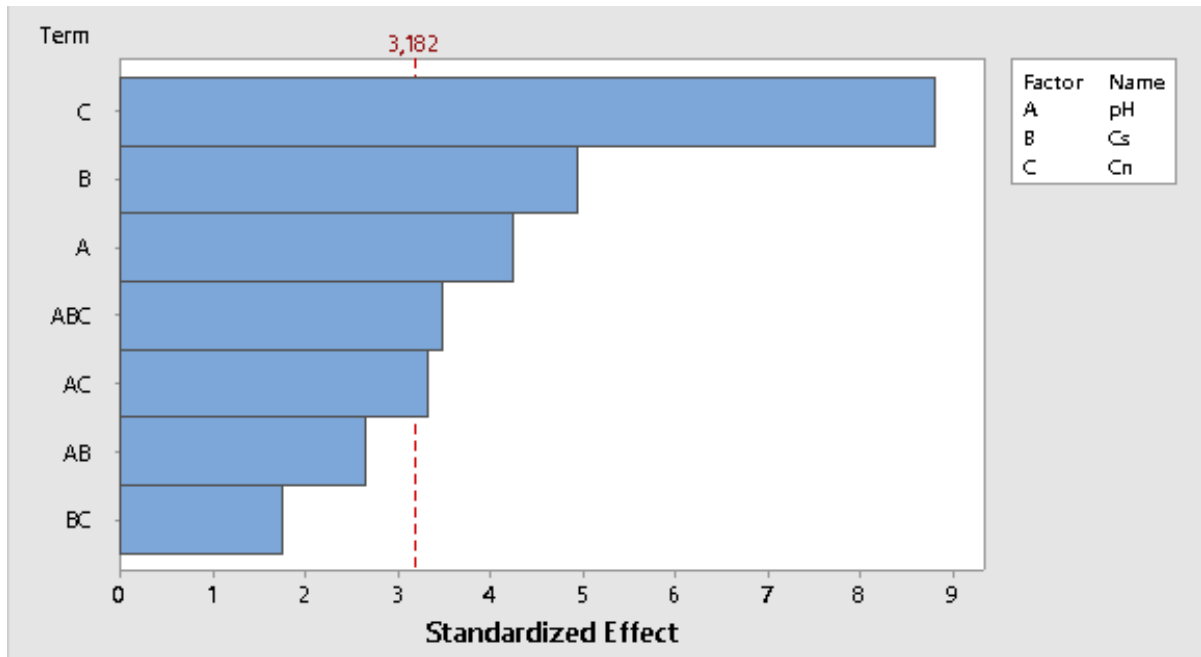
Tabela 7 - Resumo do modelo estatístico utilizado na avaliação dos resultados do DCC 2³ com 3 pontos centrais

Estatística de regressão	
R múltiplo	0.990
R-Quadrado	0.981
R-quadrado ajustado	0.936
Erro padrão	5.945

Fonte: Autora (2023).

No gráfico de Pareto da figura 10 é possível observar que no modelo adotado, o pH, a sacarose e o sulfato de amônio influenciaram significativamente a atividade hidrolítica da lipase, bem como a interação entre as 3 variáveis e a interação do pH com o sulfato de amônio. A concentração de sulfato de amônio se mostrou a variável de maior efeito sobre a atividade da lipase.

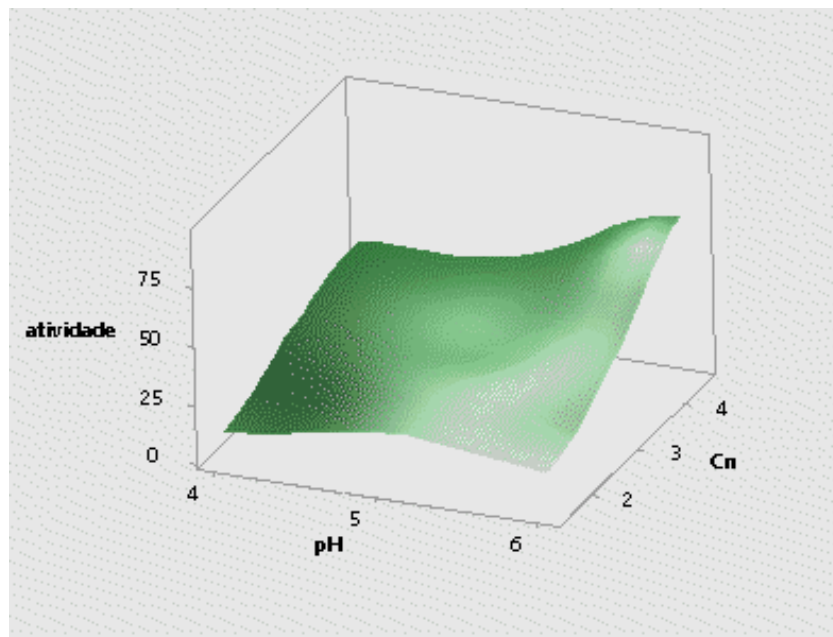
Figura 10 - Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados (standardized effect) de pH, concentração de sacarose (Cs) e concentração de sulfato de amônio (Cn) na atividade da lipase de *Aspergillus oryzae*, com $\alpha=0.05$



Fonte: Autora (2023).

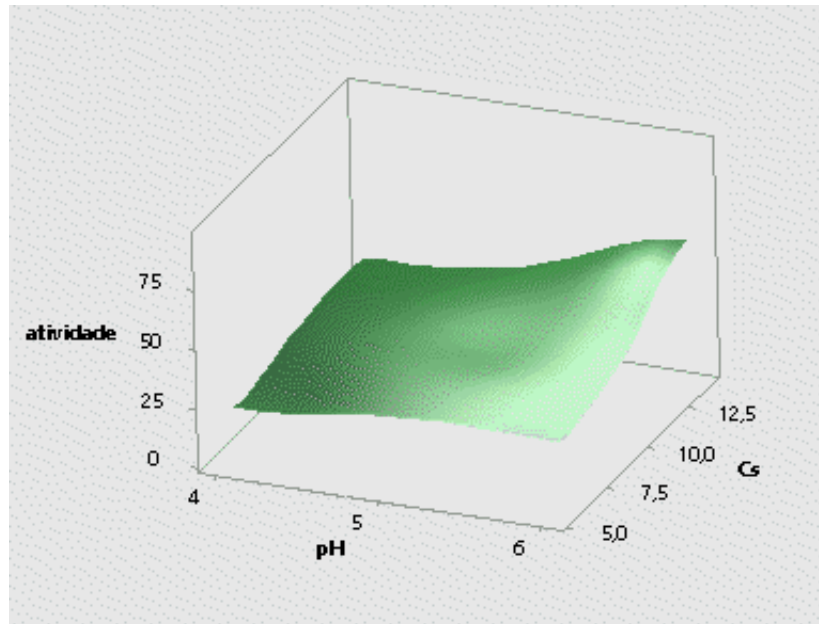
Nos gráficos das figuras 11, 12 e 13 é possível observar a relação entre cada variável estudada e se aumentam ou diminuem a resposta.

Figura 11 - Gráfico de superfície mostrando a atividade hidrolítica (U/mL) da lipase de *Aspergillus oryzae* em função da concentração de sulfato de amônio (Cn, g/L) e pH



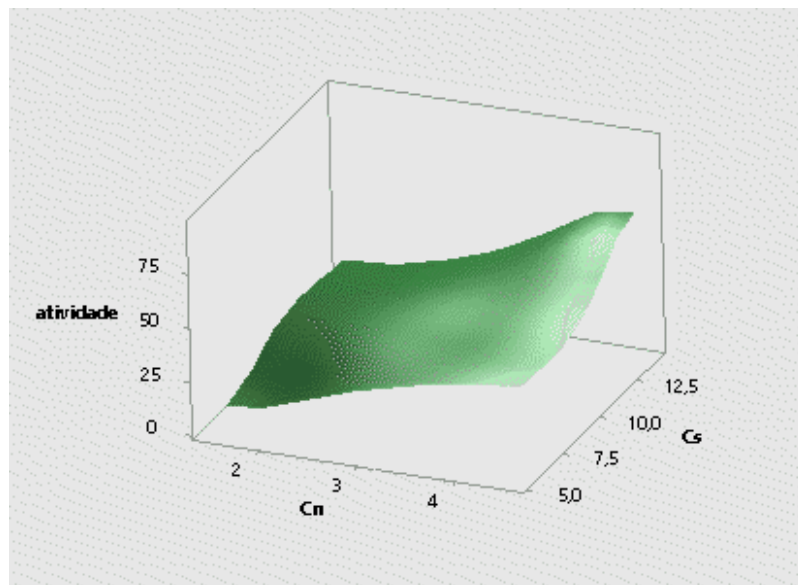
Fonte: Autora (2023).

Figura 12 - Gráfico de superfície mostrando a atividade hidrolítica da lipase (U/mL) de *Aspergillus oryzae* em função da concentração de sacarose (C_s , g/L) e pH



Fonte: Autora (2023).

Figura 13 - Gráfico de superfície mostrando a atividade hidrolítica (U/mL) da lipase de *Aspergillus oryzae* em função da concentração de sulfato de amônio (C_n , g/L) e da concentração de sacarose (C_s , g/L)



Fonte: Autora (2023).

Nota-se que a atividade hidrolítica se dirige a seu valor máximo conforme o valor das variáveis de cada gráfico aumenta, e a seu valor mínimo quando essas variáveis diminuem.

Segundo Schmidell et al. (2001) e Pandey (2003), cada microrganismo tem um valor ótimo de pH para seu desenvolvimento, sendo a faixa de 4,5 a 6 a ideal para a maioria dos fungos. Segundo os autores o pH afeta significativamente o metabolismo do microrganismo pois altera seu conjunto enzimático. Ainda, segundo Ahamed, Singh e Ward (2005), um fator de grande influência na produção de lipase é a síntese de proteases por parte do fungo, que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas das proteínas e, portanto, podem desnaturar a lipase. Com isso, os autores concluem que é importante se estudar fatores que possam contribuir com a diminuição da produção de protease, para que assim haja aumento da produção da enzima de interesse. Nesse contexto, O'Donnell et al. (2001) conseguiram melhorar a produção de proteínas utilizando *Aspergillus niger* através do controle de pH do meio, onde no pH ideal foi observado que a formação das proteases ocorreu somente após o esgotamento da fonte de carbono, devido ao início do processo de autólise celular.

Em vista disso, neste trabalho o pH mais ácido ocasionou na menor atividade da lipase, mostrando que foi o que mais se distanciou do valor ideal. Por conta disso, pode ter gerado um ambiente menos propício para a síntese e favorecido a síntese de proteases que desnaturaram a lipase. Já as condições mais próximas da neutralidade causaram um aumento na produção, mostrando que proporcionaram um espaço onde o *A. oryzae* pode realizar a síntese de maneira mais eficiente.

Os resultados obtidos por Alabdall et al. (2020) utilizando *A. niger* mostraram que o aumento da acidez do meio causou inibição da produção da lipase, e o aumento da alcalinidade causou aumento da produção, e, por fim, consideraram o pH 7,5 como o ideal. Já Amin et al. (2021b) e Zheng et al. (2019) determinaram o pH 5 como o melhor para a produção da lipase de *Penicillium fellutanum* e de *Aspergillus oryzae* expressa em *Pichia pastoris*, respectivamente.

A concentração dos componentes do meio é outro fator muito importante para o crescimento e produção da lipase, uma vez que a falta ou excesso de um componente pode alterar o metabolismo celular. Estudos mostram que a concentração de fontes de carbono e nitrogênio podem afetar a morfologia do microrganismo, e avaliar a concentração desses componentes pode ajudar a economizar insumos e otimizar a produção (LI et al., 2022; PAPAGIANNI, 2004).

Neste trabalho, os maiores valores de concentração de sulfato de amônio (4,5 g/L) e de sacarose (14 g/L) constituíram a melhor condição para a síntese da lipase de *A. oryzae*. Isso mostra que o microrganismo requeria uma maior concentração dessas fontes para melhorar seu metabolismo e, conseqüentemente, a produção da enzima de interesse.

Lima et al. (2019) utilizaram *Aspergillus niger* na produção de lipase e obtiveram o melhor resultado com 15 g/L de sacarose e 4 g/L de sulfato de amônio e 1 g/L de extrato de levedura. El-Ghonemy et al. (2020) também utilizaram *Aspergillus niger* e obtiveram o melhor resultado utilizando 3 g/L de sacarose. Ameri et al. (2019) utilizaram um mutante de *Bacillus atrophaeus*, obtendo produção máxima com 5 g/L de sacarose e 1,75 g/L de sulfato de amônio. Enquanto Bharathi, Rajalakshmi e Komathi (2019) utilizaram 8 diferentes cepas de bactéria e tiveram os melhores resultados com 30 g/L de sacarose.

Dessa forma, 14 g/L de sacarose, 4,5 g/L de sulfato de amônio e pH 6 foram determinados como os melhores nesse trabalho, encerrando a etapa de estudo de melhores condições e composição do meio de cultivo para a síntese da lipase de *A. oryzae*.

5.4 Caracterização da lipase

Após a definição do melhor meio de cultivo para a síntese de lipase de *A. oryzae*, foi feito um último cultivo nas condições ideais. Com isso, foi possível realizar a caracterização da lipase sintetizada, e os dados obtidos podem ser vistos na tabela 8.

Tabela 8 - Resultados de atividade hidrolítica da lipase de *Aspergillus oryzae* obtidos pelo DCCR de 2 fatores

Experimentos	pH	Temperatura (°C)	Atividade Hidrolítica (U/mL)	Desvio Padrão
1	7,5 (1)	50 (1)	10,40	2,00
2	7,5 (1)	30 (-1)	24,80	4,21
3	4,5 (-1)	50 (1)	13,90	1,33
4	4,5 (-1)	31 (-1)	9,80	3,01

5	6,0 (0)	40 (0)	18,10	2,44
6	6,0 (0)	40 (0)	18,10	2,94
7	6,0 (0)	40 (0)	18,20	1,31
8	6,0 (0)	54,1 (1,41)	10,20	2,58
9	6,0 (0)	25,9 (-1,41)	17,70	2,32
10	8,115 (1,41)	40 (0)	19,40	1,47
11	3,885 (-1,41)	40 (0)	10,20	2,04

Fonte: Autora (2023).

O melhor resultado foi o fornecido pelo experimento 2 ($24,8 \pm 4,21$ U/mL), com pH 7,5 e temperatura de 30°C.

A tabela 9 mostra um resumo do modelo estatístico utilizado para tratar os dados, onde os resultados sugerem que o modelo de regressão se ajustou de forma satisfatória aos dados observados.

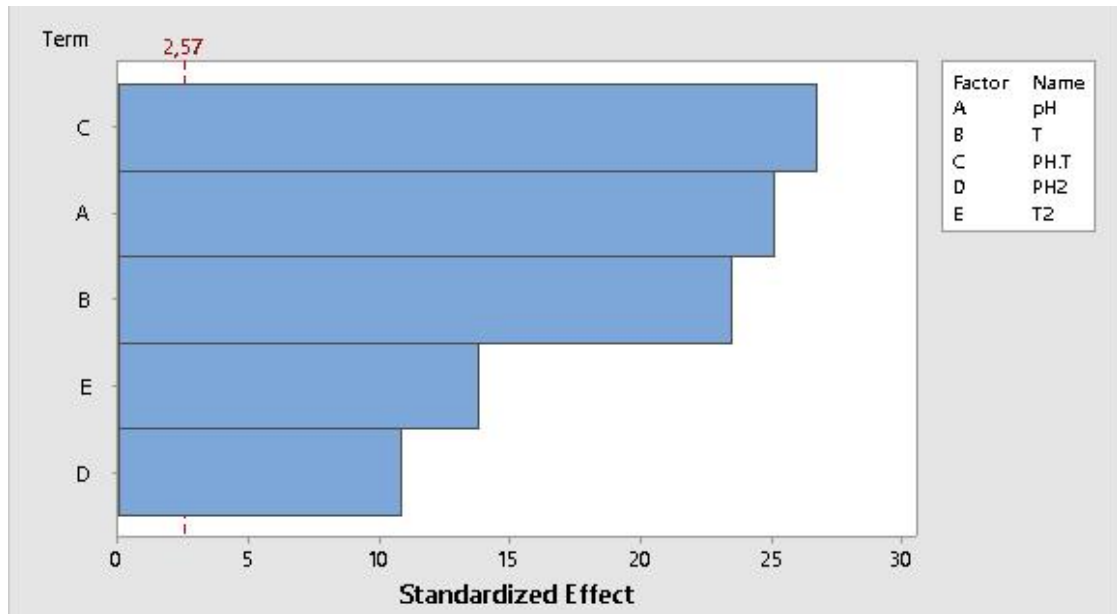
Tabela 9 - Resumo do modelo estatístico utilizado na avaliação dos resultados do DCCR de 2 fatores

Estatística de regressão	
R Múltiplo	0.999
R-Quadrado	0.998
R-Quadrado ajustado	0.995
Erro padrão	0.345

Fonte: Autora (2023).

Na figura 14 é possível ver que todos os fatores analisados afetaram significativamente a atividade da lipase, visto que a interação entre pH e temperatura foi o fator de maior relevância.

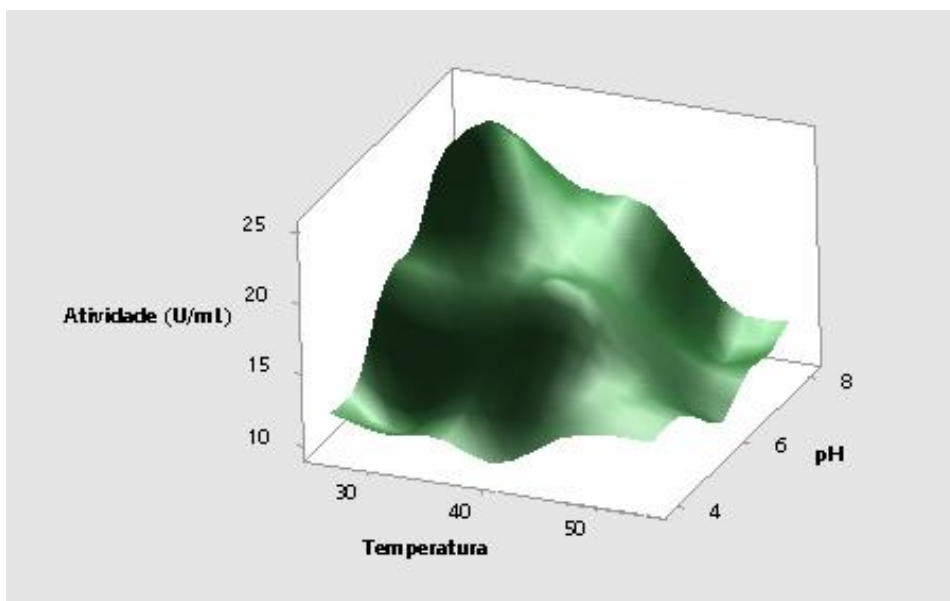
Figura 14 - Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados (standardized effect) de pH e temperatura (T) na atividade da lipase de *Aspergillus oryzae*, com $\alpha=0.05$



Fonte: Autora (2023).

Na figura 15 é possível observar a relação entre pH e temperatura e sua influência na atividade enzimática.

Figura 15 - Gráfico de superfície mostrando a atividade hidrolítica (U/mL) da lipase de *Aspergillus oryzae* em função da temperatura (°C) e do pH



Fonte: Autora (2023).

Como observado, nos pHs menores a atividade foi menor, possivelmente por conta de alterações nas cargas dos aminoácidos da enzima, levando a alterações conformacionais. Apesar de algumas enzimas tolerarem grandes variações de pH, a maioria tem boa atividade apenas em uma estreita faixa. Dessa forma, pode-se dizer que conforme o pH do meio foi se afastando do pH ideal, a atividade foi diminuindo (CABRAL; AIRES-BARROS; GAMA, 2003).

Foi também observado que em temperaturas menores a atividade diminuiu, provavelmente pelo afastamento da temperatura ideal. Sabe-se que temperaturas muito altas causam desnaturação ou desativação térmica (que afetam a estrutura terciária da enzima), e muito baixas reprimem o crescimento e a síntese. Além disso, é sabido que a temperatura também influencia a ação do pH sobre a enzima (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; GEOFFRY; ACHUR, 2018; GRAHAME; BRYKSA; YADA, 2015; CABRAL; AIRES-BARROS; GAMA, 2003).

Ayinla et al., (2021) caracterizaram a lipase produzida por *Rhizopus oryzae* e constataram que a atividade ótima foi em 55°C e pH 8. Boran et al., (2019) caracterizaram a lipase de *Streptomyces violascens* e tiveram atividade ótima a 40°C e pH 8. Já Paluzar, Tuncay e Aydogdu (2021) caracterizaram lipase de *Penicillium aurantiogriseum* e relataram atividade ótima a 40°C e pH 7. Enquanto Si-Yuan, Yan e Xiao-Wei (2020) caracterizam lipase ácida de *Aspergillus niger* e obtiveram atividade ótima em 45°C e pH 3.

Dessa forma, a lipase de *A. oryzae* obteve atividade máxima em pH 7,5 e temperatura de 30°C, sendo, portanto, caracterizada quanto a esses fatores. Nota-se que a atividade enzimática aumentou conforme o pH aumenta e a temperatura diminui. Como observado na figura 15, os pontos de pH e temperatura com atividade máxima foram extremos, sendo adequado que novos experimentos sejam feitos para se verificar se pH mais altos e temperaturas mais baixas seriam capazes de oferecer resultados ainda melhores, sendo então possível se observar uma faixa de tolerância da lipase.

6 Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização da lipase do fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*, através da avaliação de características

morfológicas do fungo e do estudo dos parâmetros operacionais relacionados à síntese.

O cultivo do *A. oryzae* em placas de Petri permitiu verificar sua viabilidade para a síntese da lipase, uma vez que foi possível caracterizá-lo de forma qualitativa e verificar sua forma de crescimento, que se deu formando inicialmente colônias de cor branca que aos poucos foram ganhando coloração amarelo-esverdeada.

O melhor tempo de cultivo foi definido como sendo de 120h, em meio de cultivo contendo sacarose e sulfato de amônio como principais fontes de carbono e nitrogênio. Nesse meio a atividade hidrolítica foi de $7,82 \pm 1,03$ U/mL, e constatou-se que essas condições proporcionaram um ambiente mais favorável para a produção de lipase, com nutrientes adequados, economicamente viáveis e com provável menor síntese de subprodutos inibidores.

O primeiro planejamento experimental determinou que pH 6, 4,5 g/L de sulfato de amônio e 14 g/L de sacarose foram as melhores condições do experimento, produzindo lipase com atividade hidrolítica de $94,33 \pm 5,51$ U/mL. Foi observado que os efeitos do pH, da sacarose, do sulfato de amônio, a da interação entre as 3 variáveis e a interação do pH com o sulfato de amônio influenciaram significativamente a atividade da lipase. Em vista desses dados, notou-se que a concentração de nutrientes ajustada foi benéfica ao fungo, e supõe-se que essas condições permitiram menos formação de protease, e conseqüentemente, menos chances de inativação da enzima de interesse.

O planejamento experimental para caracterização permitiu verificar que pH 7,5 e 30°C foram os melhores para a atuação da lipase, com atividade de $24,8 \pm 4,21$ U/mL. Essas condições propiciaram menor desnaturação e desativação térmica da enzima, e todos os fatores analisados afetaram significativamente sua atividade.

Dessa forma, este trabalho permitiu o estudo da síntese da lipase de *A. oryzae*, que se mostrou possível e com potencial de ajustes para aumento de eficiência e com possibilidades de aplicação industrial. Em vista disso, recomenda-se para trabalhos futuros que sejam testadas novas faixas de operação dos parâmetros testados, bem como o estudo da especificidade da lipase de *A. oryzae* e suas possíveis aplicações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHAM, N. Z.; AHMED, E. M. Extracellular lipase of *Aspergillus niger* NRRL3: production, partial purification and properties. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 77-83, mar. 2009.
- AHAMED, A.; SINGH, A.; WARD, O. P. Culture-based strategies for reduction of protease activity in filtrates from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 21, p. 1577-1583, 2005.
- ALABDALALL, A. H. et al. Molecular, physiological, and biochemical characterization of extracellular lipase production by *Aspergillus niger* using submerged fermentation. **PeerJ**, v. 8, p. e9425, 7 jul. 2020.
- 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, dez. 2012.
- AMERI, A. et al. Statistical optimization of cultural medium composition of thermoalkalophilic lipase produced by a chemically induced mutant strain of *Bacillus atrophaeus* FSHM2. **3 Biotech**, v. 9, n. 7, jun. 2019.
- AMIN, M. et al. Enhancing Lipase Biosynthesis by *Aspergillus Melleus* and its Biocatalytic Potential for Degradation of Polyester Vylon-200. **Catalysis Letters**, v. 151, p. 2257–2271, jan. 2021a.
- AMIN, M. et al. Optimization of Lipase Production by Response Surface Methodology and Its Application for Efficient Biodegradation of Polyester vylon-200. **Catalysis Letters**, v. 151, n. 12, p. 3603-3616, mar. 2021b.
- AYINLA, Z. A. et al. Biochemical and biophysical characterisation of a small purified lipase from *Rhizopus oryzae* ZAC3. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 40, n. 3, p. 195-208, fev. 2021.
- AYINLA, Z. A.; ADEMAKINWA, A. N.; AGBOOLA, F. K. Studies on the Optimization of Lipase Production by *Rhizopus sp.* ZAC3 Isolated from the Contaminated Soil of a Palm Oil Processing Shed. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 5, n. 2, mar./abr. 2017.
- BCC Research. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. **Relatório**, 2021.
- BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 101368, nov. 2019.
- BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G.; KOMATHI, S. Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 4, p. 898-901, out. 2019.

BORAN, R. et al. Characterisation of *Streptomyces violascens* OC125-8 lipase for oily wastewater treatment. **Biotech**, v. 9, n. 1, jan. 2019.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos (Volume I)**. São Paulo: Blucher, 2001.

BURKERT, J., MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 1, p. 77-84, jan. 2004.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. **Engenharia enzimática**. Lidel, 272p., 2003.

CHANDRA, P. et al. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, ago. 2020.

CHANG, P. K. et al. *ASPERGILLUS* - Introduction. **Encyclopedia of Food Microbiology**. Academic Press, 2. ed, p. 77-82, 2014.

CHAPMAN, J.; ISMAIL, A.; DINU, C. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. **Catalysts**, v. 8, n. 6, p. 238, jun. 2018.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus sp.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 193-197, mar. 2004.

DABA, G. M.; MOSTAFA, F. A.; ELKHATEEB, W. A. The ancient koji mold (*Aspergillus oryzae*) as a modern biotechnological tool. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 52, jun. 2021.

DALMAU, E. et al. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9-10, p. 657-663, jun. 2000.

DUTTA, B. et al. Statistical optimization of media components for production of extracellular lipase from edible mushroom *Cantharellus cibarius*. **Biologia Futura**, v. 73, n. 3, p. 315-325, ago. 2022.

EL-GHONEMY, D. H. et al. Thermo-alkali-stable lipase from a novel *Aspergillus niger*: statistical optimization, enzyme purification, immobilization and its application in biodiesel production. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 51, n. 3, p. 225-240, ago. 2020.

ENSHASY, H. A. E. Fungal morphology: a challenge in bioprocess engineering industries for product development. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 35, mar. 2022.

FERREIRA-DIAS, S. et al. Structured Lipids for Foods. **Encyclopedia of Food Chemistry**. Elsevier, 1. ed. p. 357-369, 2019.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 241-253, abr. 2018.

GOMI, K. *ASPERGILLUS* | *Aspergillus oryzae*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, Academic Press, 2. ed, p. 92-96, 2014.

GRAHAME, D. A. S.; BRYKSA, B. C.; YADA, R. Y. Factors affecting enzyme activity. **Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality**. Elsevier, 1. ed, p. 11-55, 2015.

ILESANMI, O. I. et al. Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. **Scientific African**, v. 8, p. e00279, jul. 2020.

JOSHUA, C. J. Metabolomics: A Microbial Physiology and Metabolism Perspective. **Methods in Molecular Biology**, v. 1859, p. 71-94, nov. 2018.

LI, C. et al. Optimization of the Fermentative Production of *Rhizomucor miehei* lipase in *Aspergillus oryzae* by Controlling Morphology. **Bioengineering**, v. 9, n. 11, p. 610, out. 2022.

LI, Y. et al. Screening, purification, and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* isolated from stuffed buns steamers. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 20, n. 4, p. 332-342, abr. 2019.

LIMA, L. G. R. et al. Lipase Production by *Aspergillus niger* C by Submerged Fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, out. 2019.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, J.; BENAIGES, M. D.; VALERO, F. *Rhizopus oryzae* lipase, a promising industrial enzyme: Biochemical characteristics, production and biocatalytic applications. **Catalysts**, v. 10, n. 11, p. 1-50, nov. 2020.

LOTTI, M. et al. Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. **Chemistry and physics of lipids**, vol. 93, n. 1-2, p. 143-148, jun. 1998.

MA, X. et al. Optimization of Low-Temperature Lipase Production Conditions and Study on Enzymatic Properties of *Aspergillus Niger*. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 40, n. 4, p. 1364-1374, set. 2021.

MAFTUKHAH, S.; ABDULLAH, A. Cellulase Enzyme Production from Rice Straw Using Solid State Fermentation and Fungi *Aspergillus niger* ITBCC L74. **MATEC Web of Conferences**, v. 156, n. 01010, mar. 2018.

MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: a review, **Journal of Biotech Research**, v. 8., n. 1, p. 58-77, 2017.

MOO-YOUNG, M. **Comprehensive biotechnology**. 3. ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2019.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 1278 p., 2019.

O'DONNELL, D., et al. Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, n. 8, p.187-193, 2001.

PALUZAR, H.; TUNCAY, D.; AYDOGDU, H. Production and characterization of lipase from *Penicillium aurantiogriseum* under solid-state fermentation using sunflower pulp. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 34, n. 9, p. 333-342, mar. 2021.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

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

RIGO, D. et al. Microbiological Production of Enzymes: A Review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9232–9254, 2021.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica (Volume II)**. São Paulo: Blucher, 2001.

SEGUINOT, P.; ORTIZ-JULIEN, A.; CAMARASA, C. Impact of Nutrient Availability on the Fermentation and Production of Aroma Compounds Under Sequential Inoculation with *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 305, fev. 2020.

SHAKIL, T.; AHMED, A.; SOHAIL, M. Production of Lipases from *Zygosaccharomyces mrakii* TS16. **Pakistan Journal of Botany**, v. 52, n. 3, dez. 2019.

SHARMA, A. K. et al. Lipase production from a wild (LPF-5) and a mutant (HN1) strain of *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 41, p. 2292-2300, out. 2016.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, dez. 2001.

SI-YUAN, Z.; YAN, X.; XIAO-WEI, Y. Improved Homologous Expression of the Acidic Lipase from *Aspergillus niger*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 196-205, fev. 2020.

SOARES, C. M. et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 77-79, p. 745-757, 1999.

- TRİYASWATI, D.; ILMI, M. Lipase-producing Filamentous Fungi from Non-dairy Creamer Industrial Waste. **Microbiology and Biotechnology Letters**, v. 48, n. 2, p. 167-178, jun. 2020.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12 Porto Alegre: Artmed, 2017, 935 p.
- UGO, A. K. et al. Microbial Lipases: A Prospect for Biotechnological Industrial Catalysis for Green Products: A Review. **Fermentation Technology**, v. 6, n. 2, 12 p., ago. 2017.
- XU, X.; KRISTENSEN, J. B.; ZHANG, H. Production of structured lipids with functional health benefits. **Novel Enzyme Technology for Food Applications**, p. 270-284, 2007.
- YU, X. W.; XU, Y.; XIAO, R. Lipases from the genus *Rhizopus*: Characteristics, expression, protein engineering and application. **Progress in Lipid Research**, v. 64, p. 57-68, out. 2016.
- ZHENG, J. et al. High-level expression and characterization of a stereoselective lipase from *Aspergillus oryzae* in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 155, p. 1-7, mar. 2019.