
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGIA APLICADA**

ALEXANDRE VIDEIRA

**LIPASES PRODUZIDAS POR FUNGOS DERIVADOS DE AMBIENTE MARINHO: OTIMIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA**

Rio Claro
2014



ALEXANDRE VIDEIRA

LIPASES PRODUZIDAS POR FUNGOS DERIVADOS DE AMBIENTE MARINHO: OTIMIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas -
Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Lara Durães
Sette

Co-orientadora: Profa. Dra. Eleonora Cano
Carmona

Rio Claro
2014

547.758 Videira, Alexandre
V652L Lipases produzidas por fungos derivados de ambiente marinho: otimização, purificação e caracterização bioquímica / Alexandre Videira. - Rio Claro, 2014
84 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Lara Durães Sette
Coorientador: Eleonora Cano Carmona

1. Enzimas. 2. Lipa - Produção. 3. Lipase. 4. Trichoderma harzianum. 5. Otimização da produção. 6. Purificação. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

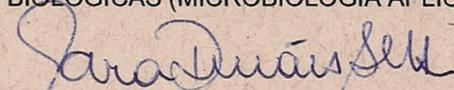
TÍTULO: LIPASES PRODUZIDAS POR FUNGOS DERIVADOS DE AMBIENTE MARINHO:
OTIMIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

AUTOR: ALEXANDRE VIDEIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE

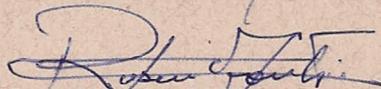
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



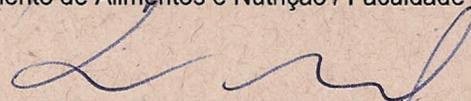
Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Bociências de Rio Claro



Prof. Dr. RUBENS MONTI

Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas



Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP

Data da realização: 28 de maio de 2014.

*Dedico este trabalho
à minha família pelo amor e apoio*

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio, dedicação e auxílio.

A professora doutora Lara Durães Sette, pela orientação e pela oportunidade de integrar o seu grupo de pesquisa.

A professora doutora Eleonora Cano Carmona, pela co-orientação e ensinamentos.

Ao professor doutor André Rodrigues e ao Lucas, pela ajuda e trabalho realizado na identificação dos fungos.

Ao Alex Almeida, pelas discussões e sugestões ao trabalho. Seu apoio, confiança e amizade foram fundamentais para o bom desenvolvimento deste trabalho.

A Daniela Flávia e Cárol Terrone, pelas sugestões e ajuda no laboratório com gratuidade e atenção.

Ao professor Jonas Contiero pelas dicas e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Corso, pela aula particular sobre espectrofotometria sem exigir absolutamente nada.

Aos amigos do laboratório de micro-organismos industrial LAMAI, laboratório de bioquímica de micro-organismos e do departamento de bioquímica, pelos bons momentos que passamos juntos: Juliana Santos, Gabriela Licursi, Ramon, Vitor Hugo, Rafael, Mariana Barato, Viviane Lopes, Paulo Renato, Ivo, Érica, Graziela, Rafael, Mariana Vida, Pedro, Danilo, Lucas, Weila Paixão, Thiago, Jaqueline, Thayse, Márcio, Barbara, Eduardo Morales, Juliana Montesinos, Cárol, Túlio, Daniela Flávia, Sadala, Paola, Marcela, Roberta, Fabrício, Vinicius, Tássio, Quimi, César e Carolina.

A Jaqueline e Jean, por me ensinar a montar lâminas.

Aos técnicos de laboratório Carmen, Fátima, Beto e Adriano.

À secretaria de pós-graduação, Philipi, Rose, Ivana, pelas informações e inúmeros auxílios prestados.

À secretaria do departamento de bioquímica: Ângela, pelas informações e inúmeros auxílios prestados.

Ao Anderson pela ajuda na execução da eletroforese.

À equipe do CEIS, centro de estudos de insetos sociais, principalmente ao Miagui e a Nathalia.

Aos funcionários da UNESP/Rio Claro, pela atenção.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada,
pela oportunidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPESP e CNPq, pelo auxílio financeiro dado ao projeto.

RESUMO

Lipases são hidrolases (triacilglicerol acil hidrolases, EC 3.1.1.3) capazes de hidrolisar ésteres carboxílicos de cadeia longa liberando monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol. Em adição, as lipases são eficientes em reações de síntese como esterificação, glicerólise, aminólise e transesterificação, essa capacidade relacionada ao deslocamento do equilíbrio da reação no sentido de hidrólise ou síntese dependendo da concentração de água presente no meio, característica que as tornam biocatalizadores muito versáteis, com importantes aplicações biotecnológicas, como em indústrias de alimentos, detergentes, farmacêutica, couro, têxtil, cosméticos e papel. O presente trabalho objetivou identificar as seis espécies de fungos lipolíticos, otimizar a produção dessa enzima pela linhagem selecionada, bem como purificar e caracterizar parcialmente a lipase produzida em condição otimizada. A atividade lipase foi determinada após cultivos submersos, objetivando o aumento da produção da enzima. Os fatores avaliados no processo de otimização da produção de lipase foram: meios minerais, tempo de cultivo, fontes de carbono e nitrogênio e suas concentrações, pH e inóculo. A avaliação das melhores condições de cultivo foi realizada pela atividade lipase, determinada pelo íon *p*-nitrofenol (pNP) liberado na hidrólise do substrato sintético *p*-nitrofenil palmitato a 37 °C. O uso de marcadores moleculares permitiu identificar os seis fungos lipolíticos até espécie, exceto para a linhagem *Fusarium* sp. CBMAI 1227. A metodologia de triagem dos fungos para produção de lipase em meio neutro permitiu a seleção do isolado *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229 como melhor produtor. A melhor condição para produção de lipase ($231,58 \pm 35,59$ U mL⁻¹) foi alcançada após 120 horas de cultivo a 25 °C e 150 rpm de agitação utilizando meio mineral Olson e Johnson (1948), suplementado com óleo de girassol 3,0% (v/v), peptona 2,0% (m/v), extrato de levedura 0,2% (m/v), pH 7,0 e inoculado com suspensão contendo de $1,0 - 2,0 \times 10^6$ conídios mL⁻¹. A lipase foi purificada utilizando cromatografia de interação hidrofóbica em octil agarose, sendo eluída com 0,75% de Triton X-100. O rendimento do processo foi de 84,9%, a atividade específica foi de 754,2 U mg⁻¹, de proteína e o fator de purificação de 59. A amostra apresentou homogeneidade eletroforética, sendo a massa molecular da enzima estimada em 16,1 kDa por SDS-PAGE. A atividade ótima dessa enzima foi de pH 6,0 e apresentou atividade lipase acima de 60% na faixa de pH 3,0 a 7,5 em tampão McIlvaine. O estudo da produção de lipase por *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229 isolado da esponja *Petronica citrina* é inédito e os resultados obtidos mostram-se promissores para posterior aplicação dessa enzima

Palavras chave: lipase, *Trichoderma harzianum*, caracterização taxonômica, otimização da produção, purificação e caracterização bioquímica.

ABSTRACT

Lipases are hydrolases (triacylglycerol acylhydrolases EC 3.1.1.3) capable of hydrolyzing carboxyl esters of long-chain acylglycerol release mono- or diacylglycerol, free glycerol and fatty acid. In addition, the lipases are effective for synthesis reactions such as esterification, glycerolysis, transesterification and aminolysis, this capability related to the displacement of the equilibrium of the reaction towards synthesis or hydrolysis inherent in the concentration of water present in the medium, the characteristic that makes biocatalysts very versatile, with important biotechnological applications. Such as food, detergents, pharmaceutical, textile, leather, paper and cosmetics industries. This work aimed to identify six species of fungi that produce lipase, optimize the production of this enzyme by lineage selected and purify and characterize partially the lipase produced in optimal condition. Enzyme activity was determined after submerged cultures, aiming to increase enzyme production. The factors measured in this optimization process of lipase production were: mineral components, time of cultivation, source of carbon and nitrogen and their concentration, pH and inoculum. The use of molecular markers allowed us to identify the six lipolytic fungi until species, except for strain *Fusarium* sp. CBMAI 1227. The methodology of screening of fungi for the production of lipase in neutral medium allowed the selection of the isolated *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229 as best producer. The evaluation of improved cultivation conditions was assayed by lipase activity, determined through hydrolysis releasing ion ρ -nitrophenol (pNP) of ρ -nitrophenyl-palmitate (pNPP) as substrate synthetic at 37 °C. The best condition for lipase production ($231,58 \pm 35,59 \text{ U mL}^{-1}$) was reached after 120 hours of cultivation, 25 °C and 150 rpm in medium mineral Olson & Johnson (1948), supplemented with sunflower oil 3,0% (v/v), peptone 2,0% (w/v), yeast extract 0,2% (w/v), pH 7,0 and suspension inoculum $1,0 - 2,0 \times 10^6$ conidia mL^{-1} . The lipase was purified using hydrophobic interaction chromatography on octyl agarose, and eluted with 0.75% Triton X-100. The yield was 84.9%, the specific activity was 754.2 U mg^{-1} of protein and purification factor of 59. The sample showed electrophoretic homogeneity, and the molecular mass of the enzyme estimated at 16.1 kDa by SDS-PAGE. The optimal activity of this enzyme was pH 6.0 and showed lipase activity above 60% in the pH range from 3.0 to 7.5 in McIlvaine buffer. The study of the production of lipase by *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229 isolated from sponge *Petronica citrina* never had been published and the results obtained showed promising for later application of this enzyme.

Keyword: lipase, *Trichoderma harzianum*, optimal production, purification, taxonomic characterization and biochemistry characterization

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Pesquisa na literatura contendo as palavras-chave “enzimas marinhas” (branco), “produtos naturais marinhos” (cinza claro) e “biocatalisadores” (cinza escuro) durante as décadas de 1961 a 2009. Levantamento realizado no banco de dados da CAPLUS e MEDLINE. 21
- Figura 2:** Reação de hidrólise realizada por triacilglicerol hidrolases. 23
- Figura 3:** Outras reações catalisadas por triacilglicerol hidrolases. 23
- Figura 4:** Identificação das potenciais hidrólises de ligações ésteres por lipase em uma molécula de triacilglicerol. 24
- Figura 5:** Modelo da estrutura secundária de um α/β hidrolase em forma de diagrama. α hélices e folhas β são representadas por cilindros brancos e setas cinzas, respectivamente. A tríade catalítica está indicada por pontos pretos. Linhas tracejadas indicam possíveis interações. 25
- Figura 6:** Modelo de estrutura α/β hidrolase da lipase de *Streptomyces exfoliatus*. As α hélices são rotuladas consecutivamente de H0 a H6, enquanto que as folhas β são rotuladas de B1 a B9 e representadas por setas que indicam a sua direção. Os *loops* nas extremidades C-terminais das folhas β estão marcados a partir de C-L1 a C-L8. A dobra nucleofílica está entre B5 e H3. Os três resíduos catalíticos são mostrados e estão rotulados como Ser131, Asp177 e His209. (a) Diagrama que mostra a disposição dos elementos da estrutura secundária, a α hélice H0 na porção N-terminal não é mostrada para dar clareza à figura. (b) Estrutura terciária e a localização do sítio ativo. 25
- Figura 7:** Atividade catalítica de esterase (à esquerda) e lipase (à direita) em função da concentração de substrato. A atividade catalítica de esterase torna-se constante quando toda a enzima está associada ao substrato [ES]. A atividade catalítica de lipase é quase nula quando o substrato está solúvel, em baixa concentração, ocorrendo um aumento da atividade quando a Concentração Micelar Crítica (CMC) é ultrapassada. 26
- Figura 8:** Modelo para a ligação interfacial e ativação da lipase de *Thermomyces lanuginosa*. Na esquerda, (A) Lipase em solução está na forma fechada (inativa), com a tampa (preto) cobrindo o sítio ativo; (B) Ligação da lipase à pequenas vesículas unilamelares de lipídeos aniônicos, promovendo deslocamento da tampa e expondo uma grande cavidade hidrofóbica em torno do sítio ativo que interage com a interface lipídica, estabilizando a forma aberta (ativa); (C) O substrato particionado (cinza) pode então acessar a tríade catalítica. 27
- Figura 9:** Simulação do movimento da tampa da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*. (A) (i) conformação aberta mostrando resíduos da cavidade do sítio ativo em amarelo, e resíduos das tampas em vermelho (tampa 1) e azul (tampa 2). (ii) Conformação fechada mostrando as tampas sobre o sítio ativo da enzima impedindo o acesso ao substrato. (B) Evolução temporal do fechamento da tampa; em azul, corresponde às tampas abertas da

lipase, enquanto o vermelho indica a posição das tampas, após 3 ns (i), 7 ns (ii), e 10 ns (iii). 27

Figura 10: Modelo de ação de lipase sobre substrato solúvel e insolúvel, com uma lipase que possui modificação conformacional para ativação. Os símbolos indicados são: E - lipase dissolvida inativa; E* - lipase dissolvida ativa; E_s* - lipase absorvida ativa; E_{is}* - lipase absorvida inativa; S_w - substrato solúvel em água; S - substrato insolúvel; E*S_w - e E_s*S complexo lipase-substrato; P_w e P produto em água e na fase lipídica, respectivamente. 28

Figura 11: Mecanismo de reação de lipase. (i) Ligação do lipídeo, ativação do resíduo de serina pela histidina e ataque nucleofílico ao átomo de carbono carbonílico do substrato pelo oxigênio da serina. (ii) Formação do intermediário transitório tetraédrico, com estabilização do oxigênio por ligações de hidrogênio com dois grupos -NH peptídicos. A histidina doa um próton para o componente álcool que sai do substrato. (iii) O intermediário covalente (acil enzima), no qual o componente ácido do substrato é esterificado ao resíduo serina da enzima. A entrada da molécula de água é ativada pelo resíduo de histidina, e a hidroxila resultante realiza um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do intermediário covalente. (iv) O resíduo de histidina doa um próton ao átomo de oxigênio do resíduo de serina ativo, a ligação éster entre a serina e o componente acil é quebrada, e o produto acil é liberado como ácido carboxílico. 30

Figura 12: Árvore filogenética inferida a partir das sequências geradas neste estudo e obtidas do banco de dados do GenBank (códigos em parênteses). As espécies *Aspergillus leporis* CBS 151.66, *Aspergillus togoensis* CBS 272.89, *Aspergillus coremiiformis* CBS 553.77 e *Aspergillus coremiiformis* foram usadas como *outgroups*. Em negrito, os isolados estudados. Destaque em cinza, a clade a qual pertence à espécie. Números sobre os ramos indicam valores de *bootstrap*. A história evolutiva foi inferida usando Kimura 2-parâmetros e distribuição gamma, pelo método de máxima verossimilhança. 53

Figura 13: Árvore filogenética inferida a partir das sequências geradas neste estudo e obtidas do banco de dados do GenBank (códigos em parênteses). A espécie *Aspergillus violaceofuscus* CBS 123.27 foi usada como *outgroup*. Em negrito, a espécie estudada. Destaque em cinza, a clade a qual pertence à espécie. Números sobre as ramificações indicam valores de *bootstrap*. A história evolutiva foi inferida usando Kimura 2-parâmetros mais distribuição gamma, pelo método de máxima verossimilhança. 54

Figura 14: Seleção dos melhores fungos filamentosos produtores de lipase em diferentes meios básicos, água destilada (água d), água do mar artificial (ASW) e cloreto de sódio (NaCl). *Fusarium* sp. CBMAI 1227, *Aspergillus caelatus* CBMAI 1228, *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229, *Trichoderma longibrachiatum* CBMAI 1230, *Aspergillus caelatus* 1231 e *Aspergillus* cf. *tubingensis* CBMAI 1232. 55

Figura 15: Curva de crescimento acompanhado da atividade enzimática de *T. harzianum* CBMAI 1229 durante 144 horas. Cultivado em com meio mineral de (VOGEL, 1956), 2,0% de óleo de oliva e 0,2% de extrato de levedura, 25 °C, a 150 rpm. 56

Figura 16: Curva de crescimento acompanhado da atividade enzimática de *Aspergillus cf. tubigensis* CBMAI 1232 durante 144 horas. Cultivado em com meio mineral de (VOGEL, 1956), 2,0% de óleo de oliva e 0,2% de extrato de levedura, 25 °C, a 150 rpm.

57

Figura 17: Atividade enzimática de lipase de *T. harzianum* CBMAI 1229 em diferentes meios minerais: (1, modificado) (KASHMIRI; ADNAN; BUTT, 2006), (2) (ÜLKER et al., 2011), (3) (RIFAAT et al., 2010), (4) (PERA et al., 2006), (5, 6 7 e 8) (ADHAM; AHMED, 2009), (9) (COLIN; BAIGORÍ; PERA, 2011), (10) (OLSON; JOHNSON, 1948), (11 e 12, modificado) (GOCHEV et al., 2012) e (13) (VOGEL, 1956). Suplementado com 2,0 % de óleo de oliva e 0,2 % de extrato de levedura, cultivado a 25 °C e a 150 rpm.

58

Figura 18: Massa seca de *T. harzianum* CBMAI 1229 em diferentes meios minerais: (1, modificado) (KASHMIRI; ADNAN; BUTT, 2006), (2) (ÜLKER et al., 2011), (3) (RIFAAT et al., 2010), (4) (PERA et al., 2006), (5, 6 7 e 8) (ADHAM; AHMED, 2009), (9) (COLIN; BAIGORÍ; PERA, 2011), (10) (OLSON; JOHNSON, 1948), (11 e 12, modificado) (GOCHEV et al., 2012) e (13) (VOGEL, 1956). Suplementado com 2,0 % de óleo de oliva e 0,2 % de extrato de levedura, cultivado a 25 °C e a 150 rpm.

59

Figura 19: Atividade enzimática de lipase de *Aspergillus cf. tubigensis* CBMAI 1232 em diferentes meios minerais: (1, modificado) (KASHMIRI; ADNAN; BUTT, 2006), (2) (ÜLKER et al., 2011), (3) (RIFAAT et al., 2010), (4) (PERA et al., 2006), (5, 6 7 e 8) (ADHAM; AHMED, 2009), (9) (COLIN; BAIGORÍ; PERA, 2011), (10) (OLSON; JOHNSON, 1948), (11 e 12, modificado) (GOCHEV et al., 2012) e (13) (VOGEL, 1956). Suplementado com 2,0 % de óleo de oliva e 0,2 % de extrato de levedura, cultivado a 25 °C e a 150 rpm.

60

Figura 20: Massa seca de *Aspergillus cf. tubigensis* CBMAI 1232 em diferentes meios minerais: (1, modificado) (KASHMIRI; ADNAN; BUTT, 2006), (2) (ÜLKER et al., 2011), (3) (RIFAAT et al., 2010), (4) (PERA et al., 2006), (5, 6 7 e 8) (ADHAM; AHMED, 2009), (9) (COLIN; BAIGORÍ; PERA, 2011), (10) (OLSON; JOHNSON, 1948), (11 e 12, modificado) (GOCHEV et al., 2012) e (13) (VOGEL, 1956). Suplementado com 2,0 % de óleo de oliva e 0,2 % de extrato de levedura, cultivado a 25 °C e a 150 rpm.

60

Figura 21: (a) Superfície de resposta para a produção de lipase por *T. harzianum* CBMAI 1229, mostrando a interação entre extrato de levedura e peptona. (b) Curva de contorno para a produção de lipase por *T. harzianum* CBMAI 1229, mostrando a interação entre extrato de levedura e peptona.

70

Figura 22: Curva de crescimento acompanhado da atividade enzimática de *T. harzianum* CBMAI 1229 durante 192 horas.

71

Figura 23: Evolução da produção de lipase por *T. harzianum* CBMAI 1229. 1-Seleção do melhor produtor; 2-Tempo inicial de cultivo; 3-Seleção do melhor meio mineral; 4-Primeiro planejamento experimental P&B ; 5-Segundo planejamento experimental P&B ; 6-Terceiro planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-1} ; 7-Quarto planejamento experimental delineamento composto central 2^3 ; 8- Quinto planejamento experimental delineamento composto central 2^2 ; 9-Validação.

72

Figura 24: Perfil cromatográfico de eluição da lipase de *T. harzianum* CBMAI 1229 em cromatografia de interação hidrofóbica com Octil Sepharose equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9. (•) A280; (▪) atividade lipase (U mL⁻¹); (-) gradiente de Triton X-100; flechas indicam as frações reunidas.

73

Figura 25: Perfil eletroforético em SDS-PAGE (8-18%) da lipase de *T. harzianum* CBMAI 1229. Da esquerda para a direita: coluna 1 contém α -lactoalbumina (14,4 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), albumina (66,0 kDa), fosforilase b (97,0 kDa). A coluna 2 contém amostra purificada.

74

Figura 26: Efeito do pH sobre a atividade da lipase bruta e purificada de *T. harzianum* CBMAI 1229. A atividade foi determinada em tampão glicina NaOH 0,05 M para o pH 3, tampão McIlvaine para a faixa de 3,0 a 8,0, e tampão Tris-HCl 8,0 a 37°C. A atividade controle (100%) correspondeu a $95,49 \pm 2,29$ U mL⁻¹ para a enzima dialisada e $542,08 \pm 8,75$ U mL⁻¹ para a enzima purificada.

75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição em ácidos graxos de óleos vegetais.	33
Tabela 2: Fontes comerciais de lipases microbianas e suas principais aplicações industriais.	37
Tabela 3: Dados referentes aos isolados com melhores resultados de atividade lipolítica em pH 8,0 e 6,0: número de acesso na CBMAI, dados taxonômicos e de origem.	39
Tabela 4: Faixa dos valores estudados no planejamento experimental Plackett & Burman para estudo da produção de lipase por <i>T. harzianum</i> CBMAI 1229.	46
Tabela 5: Faixa dos valores estudados no planejamento experimental Plackett & Burman para estudo da produção de lipase por <i>T. harzianum</i> CBMAI 1229.	47
Tabela 6: Faixa dos valores estudados no planejamento experimental fracionado 25-1 para estudo da produção de lipase por <i>T. harzianum</i> CBMAI 1229.	47
Tabela 7: Faixa dos valores estudados no planejamento experimental completo de 3 variáveis independentes para estudo da produção de lipase por <i>T. harzianum</i> CBMAI 1229.	48
Tabela 8: Faixa dos valores estudados no planejamento experimental completo com 2 variáveis independentes para estudo da produção de lipase por <i>T. harzianum</i> CBMAI 1229.	48
Tabela 9: Matriz do planejamento experimental do tipo P&B (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática).	62
Tabela 10: Matriz do planejamento experimental do tipo P&B (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática).	63
Tabela 11: Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento Plackett & Burman com 7 variáveis.	63
Tabela 12: Matriz do planejamento experimental do tipo fatorial fracionado 2^{5-1} (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática).	65
Tabela 13: Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento experimental fracionado 2^{5-1} .	65
Tabela 14: Matriz do planejamento experimental do tipo composto central rotacional 2^3 (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática).	67
Tabela 15: Coeficientes de regressão para a resposta atividade de lipase.	67

Tabela 16: Matriz do planejamento experimental do tipo composto central rotacional 2 ² (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática).	68
Tabela 17: Coeficiente de regressão para a resposta atividade de lipase.	68
Tabela 18: ANOVA para o planejamento fatorial completo 2 ² .	69
Tabela 19: Purificação da lipase por <i>T. harzianum</i> CBMAI 1229.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ASW – Água do mar artificial

BSA – Soro de albumina bovina

CBMAI – Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria

CBS – *Fungal Biodiversity Centre*

CTAB – brometo de cetil-trimetillamônio

DMSO – Dimetilsulfóxido

E.C. – *Enzyme Commission*

IMI – *International Mycological Institute*

ITS – Espaçador interno transcrito

kDa – kilo Daltons

PCR – Reação em cadeia da polimerase

rpm – rotações por minuto

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

ρ NP – para nitrofenol

ρ NPP – para nitrofenil palmitato

U – unidade enzimática

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Micro-organismos e o ambiente marinho	18
2.2	Enzimas microbianas de origem marinha	20
2.3	Lipases.....	22
2.3.1	<i>Propriedades estruturais de lipases</i>	24
2.3.2	<i>Ativação interfacial</i>	27
2.3.3	<i>Mecanismo de ação</i>	29
2.4	Fontes de produção de lipase	30
2.5	Produção de lipases por micro-organismos	31
2.5.1	<i>Fatores nutricionais</i>	32
2.6	Purificação e caracterização bioquímica de lipases	33
2.7	Importância e aplicação das lipases.....	35
3	OBJETIVO GERAL	38
3.1	Objetivos específicos	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	Micro-organismos	39
4.2	Identificação taxonômica dos fungos filamentosos	39
4.3	Preservação dos fungos filamentosos de origem marinha	42
4.4	Preparação do inóculo	42
4.5	Esterilização do meio de cultivo	42
4.6	Obtenção do filtrado de cultura	42
4.7	Seleção do melhor fungo marinho produtor de lipase	43
4.8	Determinação inicial do tempo de cultivo	43
4.8.1	<i>Curva de crescimento de Trichoderma harzianum CBMAI 1229</i>	43
4.8.2	<i>Curva de crescimento de Aspergillus cf. tubingensis CBMAI 1232</i>	43
4.9	Seleção do meio mineral para produção de lipase	44
4.10	Avaliação de diferentes parâmetros na produção de lipase pelo fungo <i>Trichoderma harzianum</i> CBMAI 1229	45
4.10.1	<i>Planejamento experimental: Plackett & Burman com 10 variáveis</i>	45
4.10.2	<i>Planejamento experimental: Plackett & Burman com 7 variáveis</i>	46

4.10.3	<i>Planejamento experimental: Fatorial Fracionado 2⁵⁻¹</i>	47
4.10.4	<i>Planejamento experimental: Planejamento Fatorial Completo 2³</i>	47
4.10.5	<i>Planejamento experimental: Planejamento Fatorial Completo 2²</i>	48
4.10.6	<i>Validação do modelo empírico para a produção de lipase por T. harzianum CBMAI 1229</i>	48
4.11	Purificação da principal lipase de <i>T. harzianum</i> CBMAI 1229	49
4.11.1	<i>Remoção do Triton X-100</i>	49
4.11.2	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio - SDS-PAGE</i>	50
4.12	Propriedades bioquímicas da principal lipase de <i>T. harzianum</i> CBMAI 1229	50
4.12.1	<i>Efeito do pH sobre a atividade enzimática</i>	50
4.13	Métodos analíticos	50
4.13.1	<i>Avaliação do crescimento fúngico</i>	50
4.13.2	<i>Determinação da atividade lipolítica</i>	51
4.13.3	<i>Quantificação de proteínas</i>	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Identificação taxonômica dos fungos de origem marinha	52
5.2	Seleção do melhor fungo produtor de lipase em meio básico	54
5.3	Determinação do tempo inicial de cultivo	56
5.4	Determinação do melhor meio mineral para a produção de lipase	58
5.5	Otimização de produção de lipase por <i>T. harzianum</i> CBMAI 1229 utilizando planejamento experimental	61
5.5.1	<i>Validação do modelo matemático para a produção de lipase</i>	70
5.6	Purificação e caracterização da principal lipase de <i>T. harzianum</i> CBMAI 1229	72
6	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	77

1 APRESENTAÇÃO

A demanda por biomoléculas microbianas está associada à ampla variedade de aplicações dessas em processos industriais e ambientais. Biomoléculas com propriedades específicas e diferentes daquelas já utilizadas em processos tecnológicos podem ser obtidas a partir de micro-organismos encontrados em ambientes incomuns, extremos, pouco explorados ou inexplorados. O ambiente marinho representa um nicho potencial de descoberta de novas biomoléculas produzidas por micro-organismos, as quais podem apresentar propriedades de interesse em diversos setores de importância sócio-econômica. O interesse pela biotecnologia marinha tem crescido substancialmente ao longo dos últimos anos, sendo eleita pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) como uma das áreas prioritárias para o desenvolvimento humano durante o *Global Forum On Biotechnology: Marine Biotechnology – Enabling Solutions For Ocean Productivity And Sustainability*, organizado e realizado entre 30 e 31 de maio de 2012 em Vancouver no Canadá. Os micro-organismos marinhos são considerados únicos por apresentarem propriedades distintas daquelas encontradas em micro-organismos terrestres. como, por exemplo, tolerância a condições de alta salinidade e de pressão.

A variedade e ineditismo dos recursos microbianos obtidos a partir de micro-organismos do ambiente marinho, associada à possibilidade de manipulação genética, preservação (*ex situ*) e manipulação em condições de cultura em laboratório, favorecem a produção de biomoléculas de amplo interesse com potencial para produção em escala industrial e o desenvolvimento de novos processos. Considerando-se que o ainda limitado conhecimento sobre a microbiota marinha pode propiciar a descoberta de novas espécies de micro-organismos e de novas biomoléculas de alto valor agregado, a exploração da biodiversidade microbiana marinha é altamente promissora. Estudos prévios de prospecção de fungos filamentosos e leveduras que habitam o ambiente marinho têm revelado o potencial destes organismos para a produção de enzimas com possível aplicação em diversos setores de importância econômica, bem como o potencial para degradação de compostos poluentes ambientais. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo refinar a identificação das seis espécies de fungos lipolíticos, previamente selecionadas, estudar a produção de lipases pela linhagem *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229, a qual foi selecionada dentre as 6 linhagens de fungos filamentosos marinhos lipolíticos, bem como purificar e caracterizar parcialmente a lipase produzida por esse fungo, isolado da esponja *Petronica citrina*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micro-organismos e o ambiente marinho

Aproximadamente 70% da superfície do planeta é coberta por águas marinhas, um montante estimado em $1,4 \times 10^{21}$ Km³ (MUNN, 2004) capaz de fornecer água, energia e alimentos como meio de subsistência a centenas de milhares de pessoas. Além disso, o oceano é o principal estabilizador do clima global e sua superfície é usada como a principal via de comércio internacional (SUBRAMANIAN, 2012). Entretanto, a sua relevância não para por aí, pois o ambiente marinho provou ser uma rica fonte em diversidade biológica e química (BAHARUM; BENG; MOKHTAR, 2010).

A biodiversidade marinha não está restrita a apenas peixes, baleias e recifes de corais; a presença de organismos microscópicos imperceptíveis em um primeiro momento elevam a diversidade do habitat marinho a níveis tão altos, que é impossível dimensionar. As grandes variações abióticas desse ambiente obrigaram os micro-organismos a desenvolverem mecanismos de adaptações estruturais e fisiológicas, permitindo compensar os efeitos nocivos das condições adversas (BAHARUM; BENG; MOKHTAR, 2010; HUNTER-CEVERA; KARL; BUCKLEY, 2005).

Micro-organismos isolados de ambiente marinho são excepcionalmente importantes para a vida como a conhecemos, seu metabolismo permite a realização de várias etapas dos ciclos biogeoquímicos que outros organismos são incapazes de completar, criando condições sob as quais é desenvolvida a vida. Uma grande quantidade de pesquisas sobre a biogeografia de micro-organismos tem sido realizada, mas muitas incógnitas ainda persistem para elucidar e compreender a sua complexidade. Sabe-se que os micro-organismos são onipresentes, seus habitats são diversos e incluem: água aberta, sedimentos, macro-organismos marinhos, estuários e fontes hidrotermais. Além disso, os micro-organismos de ambiente marinho apresentam papel importante na estabilidade do sistema ecológico, incluindo o controle da proliferação de algas nocivas, os processos que controlam as concentrações de nutrientes em águas marinhas, entre outros (HUNTER-CEVERA; KARL; BUCKLEY, 2005; KAISER et al., 2011).

No ambiente marinho, os fungos atuam como intermediários no fluxo de energia, que flui a partir de detritos para níveis tróficos superiores e desempenham um papel importante no ciclo de regeneração de nutrientes como decompositores de matéria orgânica. Já bactérias podem servir como fonte de nutriente para muitos organismos marinhos e podem também

atuar como mediadores biológicos através da sua participação nos processos biogeoquímicos (MENEZES et al., 2010).

Fungos derivados de ambiente marinho são definidos por sua ecologia e fisiologia e podem ser divididos em fungos marinhos obrigatórios, que crescem e esporulam exclusivamente em ambientes marinhos ou estuários; e facultativos, que são de origem terrestre ou água doce capazes de crescer em ambiente marinho (KOHLMEY, 1974). Visando uma classificação mais geral para esses micro-organismos, o termo “fungos derivados de ambiente marinho” (*marine-derived fungi*) é usualmente utilizado para definir fungos isolados de amostras marinhas (e.g., esponjas, algas, madeiras, tunicados, sedimentos, corais e plantas) independentemente de serem classificados como micro-organismos marinhos obrigatórios ou facultativos (OSTERHAGE et al., 2002).

A ocorrência de organismos em um dado ambiente é determinada por fatores abióticos e bióticos. De acordo com a lei de tolerância de *Shelford*, a sobrevivência e o crescimento de organismos segue um complexo conjunto de fatores com limites máximos e mínimos dentre os quais sua existência é possível (MARGESIN; SCHINNER, 1994). Em relação aos micro-organismos aquáticos, esses fatores podem ser: temperatura, pressão, salinidade, pH, penetração de luz, resistência à radiação e a concentração de metais, além das diferentes combinações dos mesmos; como ainda a influência dos próprios micro-organismos sobre seus habitats, por consumir e remover uma variedade de compostos, alterando gradientes de materiais importantes para a vida (HUNTER-CEVERA; KARL; BUCKLEY, 2005; SALAMEH; WIEGEL, 2007b). O movimento da água do mar, por meio da ressurgência e densidade dirigida, constitui a base para inúmeros processos ecológicos, sendo particularmente importante para a circulação de nutrientes e oxigênio. Influenciando na distribuição de organismos e micro-organismos na região costeira (BARNES, 1999).

Os micro-organismos derivados do ambiente marinho estão sujeitos à variação de temperatura em um mesmo dia ou ao longo das estações do ano, uma vez que não são capazes de manter a temperatura interna. Além disso, fatores como pressão, radiação, pH, concentração de oxigênio e nutrientes são variáveis de acordo com a localização dos micro-organismos na coluna d'água (BAHARUM; BENG; MOKHTAR, 2010; MUNN, 2004; RAGHUKUMAR, 2005), exigindo um sistema metabólico robusto, extremamente hábil sob condições de estresse (TRINCONE, 2011). Assim, micro-organismos provenientes desse ambiente podem ser considerados fontes potenciais de recursos genéticos para aplicação

biotecnológica, pois são capazes de fornecer enzimas com atividade estável (DEBASHISH et al., 2005), interessantes para aplicação em diversos setores industriais.

2.2 Enzimas microbianas de origem marinha

As enzimas são biocatalizadores indispensáveis ao metabolismo de qualquer organismo e, exceto as riboenzimas, são de natureza proteica. Devido ao fato das enzimas terem como função a catálise de reações químicas, que sem a sua presença, dificilmente ocorreriam, profissionais dos setores acadêmicos e industriais vêm concentrando esforços em pesquisas relacionadas à sua utilização em diversos segmentos de importância econômica, criando um nicho de mercado com mão de obra altamente especializada e produtos com alto valor agregado. A substituição das múltiplas etapas dos processos químicos por processos biotecnológicos mais eficientes, de menor consumo energético e impacto ambiental tem levado a busca de enzimas com novos perfis de atividade. Desse modo, os micro-organismos surgem como melhor alternativa de fonte de enzimas em função da ampla variedade de espécies, que apresentam grande diversidade metabólica, permitindo a obtenção de enzimas com características diversificadas, as quais podem ser aplicadas nas mais variadas condições físico-químicas.

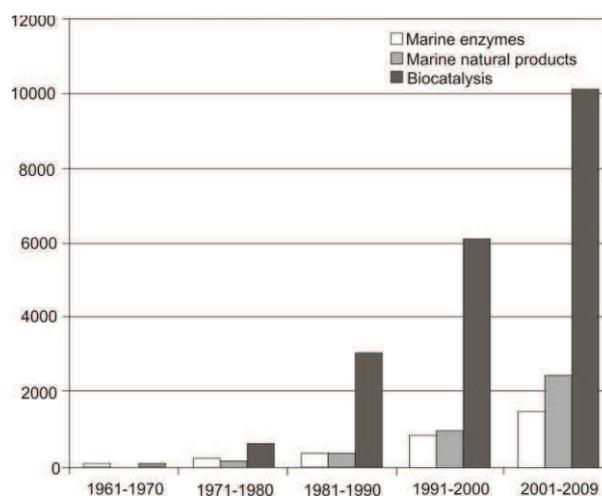
As enzimas são os principais alvos da adaptação do micro-organismos ao ambiente marinho. Assim, esses micro-organismos produzem enzimas com maior flexibilidade, mas mantendo alta atividade específica (DEBASHISH et al., 2005; HUNTER-CEVERA; KARL; BUCKLEY, 2005; TRINCONE, 2010, 2011).

Devido as propriedades das enzimas produzidas por fungos de origem marinha, tais como estabilidade térmica, tolerância a altas concentrações de sal e pressão, elas estão aptas a catalisar reações químicas, as quais suas homólogas terrestres geralmente não podem realizar (BAHARUM; BENG; MOKHTAR, 2010; SALAMEH; WIEGEL, 2007b; ZHANG; KIM, 2010). Essas propriedades impulsionam estudos sobre aplicações biotecnológicas em setores como: farmacêutico, cosmético, suplemento nutricional, higiênico, processamento de couro, produção de papel, entre outros (ANTRANIKIAN; VORGIAS; BERTOLDO, 2005; HOUGH; DANSON, 1999; PODAR; REYSENBACH, 2006; ZHANG; KIM, 2012).

Nas últimas décadas, pesquisadores vêm concentrando esforços na compreensão do enorme e inexplorado mundo das enzimas marinhas (BAHARUM; BENG; MOKHTAR, 2010; COLWELL, 2002; DEBASHISH et al., 2005). Um levantamento feito na literatura científica, no banco de dados da CAPLUS e MEDLINE, com as palavras-chave “enzimas

marinhas”, “biocatalisadores” e “produtos naturais marinhos” datados entre as décadas de 1961 a 2009 mostrou um expressivo aumento na pesquisa e desenvolvimento de patentes nos últimos anos (**Figura 1**) (TRINCONE, 2010).

Figura 1: Pesquisa na literatura contendo as palavras-chave “enzimas marinhas” (branco), “produtos naturais marinhos” (cinza claro) e “biocatalisadores” (cinza escuro) durante as décadas de 1961 a 2009. Levantamento realizado no banco de dados da CAPLUS e MEDLINE.



Fonte: (TRINCONE, 2010).

Os micro-organismos marinhos podem ser fontes de diversas enzimas com propriedades de uso industrial, como destacado nos estudos relatados abaixo: Raghukumar et al. (2004) isolou uma linhagem de fungo derivado marinho facultativo *Aspergillus niger* de amostra de mangue na Índia capaz de produzir $0,58 \text{ U mL}^{-1}$ de xilanase com característica alcalina e termoestável, com potencial aplicação em biobranqueamento de polpa de papel; testes realizados com polpa de papel durante 60 minutos a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ resultou em um decréscimo de 10 kappa e redução de 30,0% no consumo de ácido clorídrico.

Bonugli-Santos et al. (2010a), reportaram a produção de ligninases sob diferentes fontes de carbono e salinidade pelos fungos de origem marinha *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849 e *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857, isolados respectivamente dos zoantideos *Mussismilia hispida*, *Palythoa variabilis* e *Palythoa caribaeorum*, os quais foram coletados no litoral norte do Estado de São Paulo. O fungo *M. racemosus* CBMAI 847 apresentou as maiores atividades de lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac) em condição salina. Em adição, estudos de produção de lacase e detecção de genes por três basidiomicetos de origem marinha (isolados a partir das esponjas coletadas na costa brasileira *Amphimedon viridis* e *Dragmacidon reticulatum*) foram reportados por Bonugli-Santos et al., (2010b). Nesse estudo, os três

fungos foram capazes de produzir lacase, sendo verificadas as maiores atividades dessa enzima obtidas pelos fungos *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e *Peniophora* sp. CBMAI 1063 após 21 dias de cultivo em condições salinas. *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e *Tinctosporcellus* sp. CBMAI 1061 apresentaram a maior diversidade de genes que codificam para a enzima lacase, sendo 3 e 4 putativos novos genes, respectivamente. A lacase produzida pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apresentou propriedades interessantes para o setor têxtil.

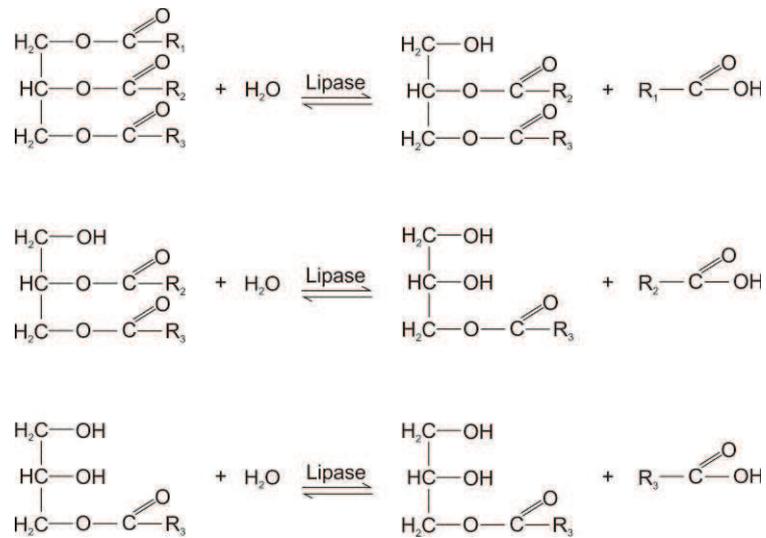
Kim et al. (2007) isolaram uma esterase de *Yarrowia lipolytica* CL180 de ambiente marinho, que manteve 40,0% da atividade enzimática a 10 °C, e possui propriedades de enantioselectividade de resolução de mistura racêmica de ofloxacina propil éster. Levofloxacina, o s-isômero de ofloxacina, apresenta atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Basheer et al. (2011) isolaram a linhagem *Aspergillus awamori* BTMFW032 da costa da Índia capaz de produzir 0,50 U mL⁻¹ de lipase, com atividade ótima em pH 7,0 a 40 °C, com potencial aplicação em bioremediação, no pré-tratamento de efluentes ricos em óleo.

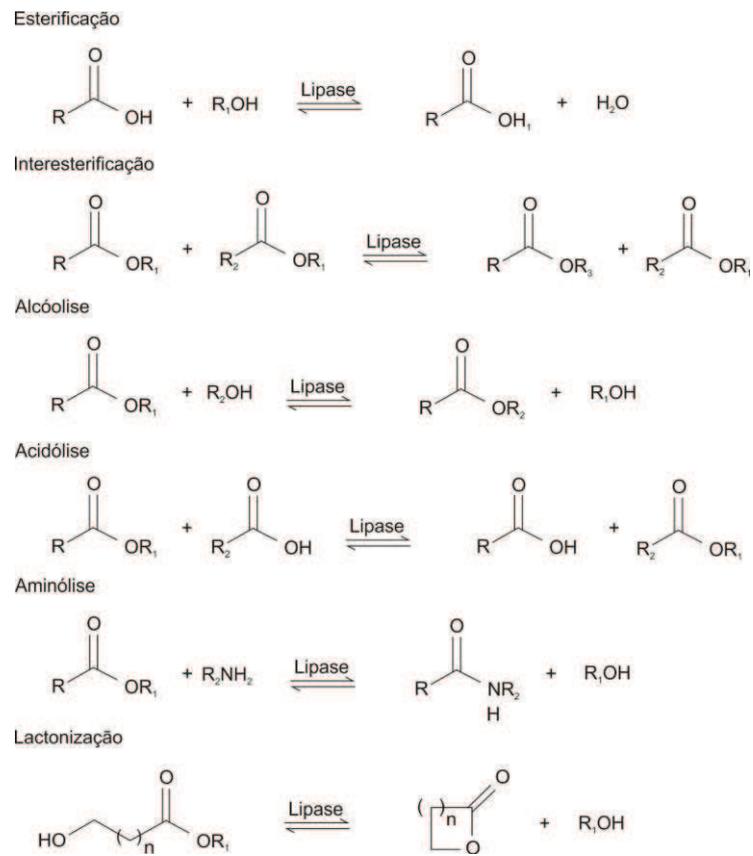
A utilização de enzimas em processos biotecnológicos vem ganhando importância a cada ano. A estimativa é de que o mercado de enzimas industriais deva atingir o faturamento de aproximadamente US\$ 4 bilhões em 2014. Dentre essas enzimas, as lipases se destacam por serem biocatalisadores versáteis, levando à obtenção de produtos com alto valor agregado (BOM et al., 2008).

2.3. Lipases

Lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são carboxilesterases que catalisam a hidrólise de acilglicerol produzindo ácidos graxos livres e glicerol (**Figura 2**) (VERGER, 1997). Além disso, as lipases são eficientes em reações de síntese como esterificação, glicerólise, aminólise (síntese de amidas) e transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises) (**Figura 3**) (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; PAQUES; MACEDO, 2006; REIS et al., 2009; ZHANG; KIM, 2012), sendo essa capacidade relacionada ao deslocamento do equilíbrio da reação no sentido de hidrólise ou síntese dependendo da concentração de água presente no meio (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004), característica que as tornam biocatalisadores muito versáteis.

Figura 2: Reação de hidrólise realizada por triacilglicerol hidrolases.

Fonte: (CASTRO et al., 2004).

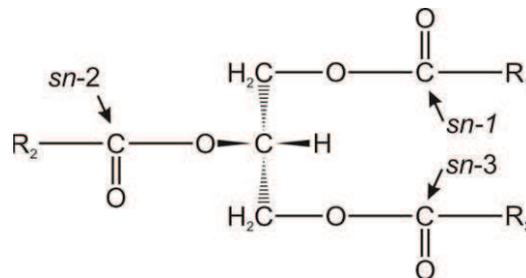
Figura 3: Outras reações catalisadas por triacilglicerol hidrolases.

Fonte: (PAQUES; MACEDO, 2006).

As lipases são classificadas com base na especificidade de hidrólise dos substratos triglicéridos. Três tipos de seletividade podem ser distinguidas como regioseletivas, tipo seletivas e enantiosseletiva. As bases para essa seletividade são apresentadas abaixo (CASAS-GODOY et al., 2012; PAQUES; MACEDO, 2006):

- Regioseletivas (**Figura 4**), subdividas em:
 1. Lipases não-específicas – hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição *sn*-1 (3) ou *sn*-2;
 2. Lipases *sn*-1, *sn*-3 específicas – hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição *sn*-1 ou *sn*-3;
- Tipo seletivas - com relação preferência ao substrato tri-, di-, ou monoglicérideo, ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao grau de insaturação da cadeia carbônica do ácido graxo;
- Enantiosseletiva – refere-se a preferência da lipase a um particular enantiômero de uma molécula quiral (*R* ou *S*).

Figura 4: Identificação das potenciais hidrólises de ligações ésteres por lipase em uma molécula de triacilglicerol.



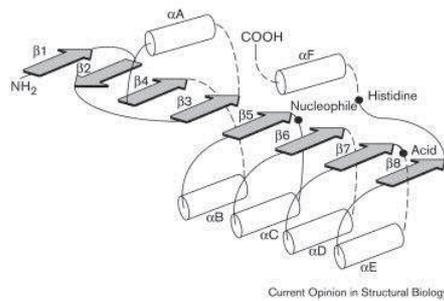
Fonte: (CASAS-GODOY et al., 2012).

2.3.1 Propriedades estruturais de lipases

As lipases são α/β -hidrolases, compostas por folhas β dispostas paralelamente e conectadas a α -hélices, sendo que a tríade catalítica constituída por Ser-His-Asp/Glu encontra-se no topo da folha β central (**Figura 5** e **Figura 6**). O resíduo de serina atua como nucleófilo, comum a todas as hidrolases, e possui um motivo consenso pentapeptídica Gly-X₁-Ser-X₂-Gly, onde X₁ é tirosina ou histidina, diferentemente das esterases, cuja sequência motivo é Gly-X-X-Leu (BRADY et al., 1990; CYGLER; SCHRAG, 1997; FERRAREZI,

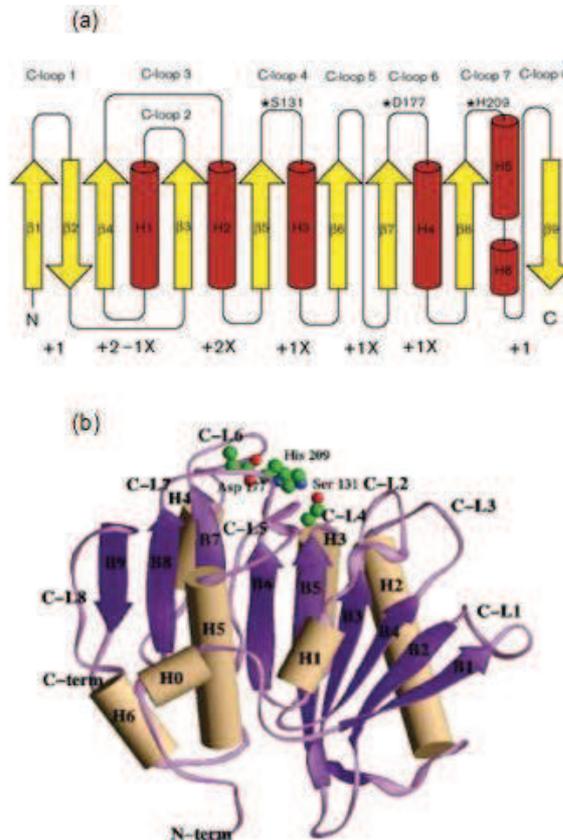
2011; HOLMQUIST, 2000; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; NARDINI; DIJKSTRA, 1999; OLLIS et al., 1992; SCHRAG; CYGLER, 1997; SVENDSEN, 2000).

Figura 5: Modelo da estrutura secundária de um α/β hidrolase em forma de diagrama. α hélices e folhas β são representadas por cilindros brancos e setas cinzas, respectivamente. A tríade catalítica está indicada por pontos pretos. Linhas tracejadas indicam possíveis interações.



Fonte: (NARDINI; DIJKSTRA, 1999).

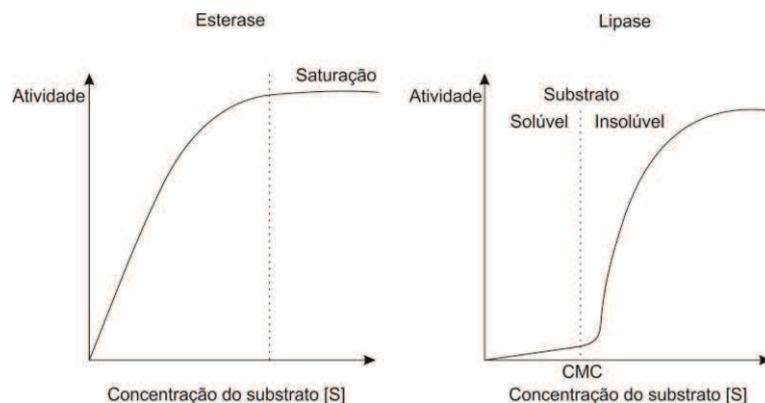
Figura 6: Modelo de estrutura α/β hidrolase da lipase de *Streptomyces exfoliatus*. As α hélices são rotuladas consecutivamente de H0 a H6, enquanto que as folhas β são rotuladas de B1 a B9 e representadas por setas que indicam a sua direção. Os *loops* nas extremidades C-terminais das folhas β estão marcados a partir de C-L1 a C-L8. A dobra nucleofílica está entre B5 e H3. Os três resíduos catalíticos são mostrados e estão rotulados como Ser131, Asp177 e His209. (A) Diagrama que mostra a disposição dos elementos da estrutura secundária, a α hélice H0 na porção N-terminal não é mostrada para dar clareza à figura. (B) Estrutura terciária e a localização do sítio ativo.



Fonte: (WEI et al., 1998).

Há importantes propriedades que diferenciam as lipases de outras hidrolases, principalmente as esterases (carboxilesterase, EC 3.1.1.1). As lipases agem sob substratos insolúveis, acilglicerol de cadeia longa, atuando em uma interface lipídio-água e apresentam baixa atividade sobre pequenas quantidades de substrato, elevando drasticamente a atividade quando o substrato forma emulsões, a partir da concentração micelar crítica (CMC) (FABER, 2011; REIS et al., 2009; SALAMEH; WIEGEL, 2007b). Essa característica foi denominada de ativação interfacial, a qual foi originalmente definida por Sarda e Desnuelle (1958). Contudo, as esterases agem sob substratos solúveis, acilglicerol de ácido carboxílico de cadeia curta, e seguem o modelo cinético de Michaelis-Menten, o qual se aplica apenas às enzimas em substratos solúveis (**Figura 7**) (FABER, 2011; REIS et al., 2009).

Figura 7: Atividade catalítica de esterase (à esquerda) e lipase (à direita) em função da concentração de substrato. A atividade catalítica de esterase torna-se constante quando toda a enzima está associada ao substrato [ES]. A atividade catalítica de lipase é quase nula quando o substrato está solúvel, em baixa concentração, ocorrendo um aumento da atividade quando a Concentração Micelar Crítica (CMC) é ultrapassada.



Fonte: (FABER, 2011).

A maioria das lipases possui um domínio hidrofóbico denominado “tampa” que encobre o sítio catalítico da enzima. A abertura da “tampa” varia de lipase para lipase; há casos extremos em que a “tampa” está inteiramente aberta ou fechada, com níveis de energia significativamente diferentes, ou ainda, “tampas” muito móveis com vários estados intermediários de níveis energéticos semelhantes (FREIRE; CASTILHO, 2008). Além disso, a conformação da tampa pode afetar a catálise e especificidade pelo substrato, como mostrado por experiências cinéticas e de mutagênese sítio dirigida (HOLMQUIST; NORIN; HULT, 1993; HOLMQUIST et al., 1993, 1995).

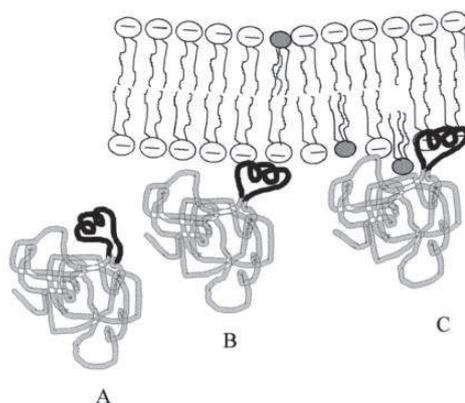
A ação catalítica de uma lipase na interface lípido-água não requer, necessariamente, a abertura e o fecho da “tampa” para cada evento catalítico. A “tampa” pode permanecer aberta quando atua no agregado lipídico. À medida que os rendimentos de hidrólise, ou seja, os

produtos da reação, são acumulados no meio, em algum momento isso força a lipase a ser desorvida da partícula lipídica, o que leva ao fechamento da tampa (HOLMQUIST, 2000).

2.3.2 Ativação interfacial

Inicialmente, a ativação interfacial foi associada a mudanças conformacionais da estrutura da lipase, resultando em uma modificação na qual a tampa aberta iria expor o sítio ativo à ligação do substrato, transformando-o em produto (**Figura 8** e **Figura 9**) (BORNSCHEUER, 2002; CAJAL et al., 2000; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; HOLMQUIST, 2000; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; NARDINI; DIJKSTRA, 1999; PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998; REIS et al., 2009).

Figura 8: Modelo para a ligação interfacial e ativação da lipase de *Thermomyces lanuginosa*. Na esquerda, (A) Lipase em solução está na forma fechada (inativa), com a tampa (preto) cobrindo o sítio ativo; (B) Ligação da lipase à pequenas vesículas unilamelares de lipídeos aniônicos, promovendo deslocamento da tampa e expondo uma grande cavidade hidrofóbica em torno do sítio ativo que interage com a interface lipídica, estabilizando a forma aberta (ativa); (C) O substrato particionado (cinza) pode então acessar a tríade catalítica.

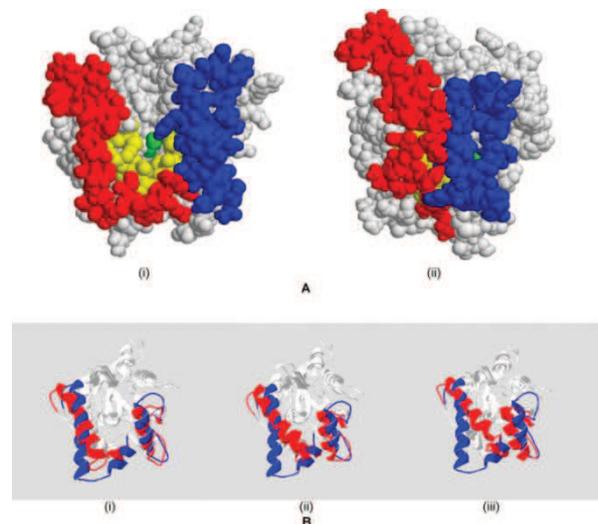


Fonte: (CAJAL et al., 2000).

Uma questão fundamental relacionada a abertura da “tampa” da lipase é se esse processo ocorre antes ou depois da adsorção a interface lipídeo-água. Martinelle e Hulk (1994) propuseram uma extensão do modelo de lipólise inicialmente descrito por Verger (1997) (**Figura 10**), que implica no equilíbrio entre os estágios de “tampa” aberta e fechada em solução. Contudo que apenas o estado aberto da “tampa” é considerado para atividade enzimática. As condições energéticas desfavoráveis a exposição do sítio ativo hidrofóbico a um ambiente aquoso, ausência de uma interface lípidio-água, levaria a uma pequena fração de moléculas de lipase com a “tampa” no estado aberto. Assim, essa pequena fração poderia explicar a tênue atividade enzimática observada em soluções, com uma pequena quantidade

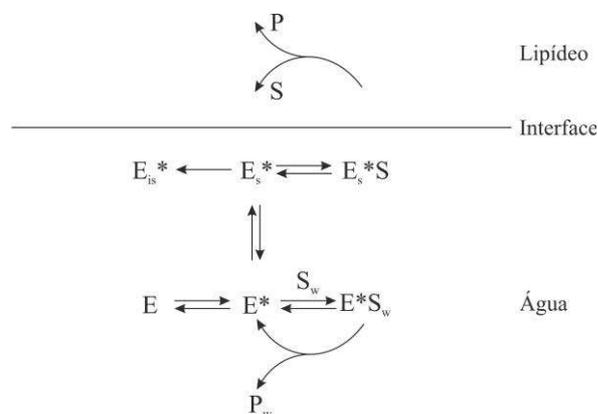
de lipídeos presentes no sistema. À medida que os lipídeos começam a formar emulsões, as lipases são logo adsorvidas pelos agregados lipídicos. Se, gotículas de lípidos são introduzidos ao sistema e uma grande área interfacial hidrofóbica é formada, uma porção da lipase com a “tampa” aberta é adsorvida aos agregados lipídicos. O estado de equilíbrio dos estágios aberto e fechado em solução faz com que a lipase, com o estágio aberto, seja adsorvida a interface. Esse mecanismo provou ser uma eficiente via de regulação da atividade lipolítica (HOLMQUIST, 2000).

Figura 9: Simulação do movimento da tampa da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*. (A) (i) conformação aberta mostrando resíduos da cavidade do sítio ativo em amarelo, e resíduos das tampas em vermelho (tampa 1) e azul (tampa 2). (ii) Conformação fechada mostrando as tampas sobre o sítio ativo da enzima impedindo o acesso ao substrato. (B) Evolução temporal do fechamento da tampa; em azul, corresponde às tampas abertas da lipase, enquanto o vermelho indica a posição das tampas, após 3 ns (i), 7 ns (ii), e 10 ns (iii).



Fonte: (CHERUKUVADA et al., 2005).

Figura 10: Modelo de ação de lipase sobre substrato solúvel e insolúvel, com uma lipase que possui modificação conformacional para ativação. Os símbolos indicados são: E - lipase dissolvida inativa; E* - lipase dissolvida ativa; E_s* - lipase absorvida ativa; E_{is}* - lipase absorvida inativa; S_w - substrato solúvel em água; S - substrato insolúvel; E*S_w - e E_s*S complexo lipase-substrato; P_w e P produto em água e na fase lipídica, respectivamente.



Fonte: (MARTINELLE; HULK, 1994).

Derewenda et al. (1994a, 1994b) questionam o excesso de simplicidade das duas teorias propostas sobre a ativação interfacial: a “teoria do substrato”, em que o foco é sobre a qualidade da interface lipídeo-água, lê-se composição do substrato; e a “teoria da enzima”, em que a conformação muda mediante a adsorção a interface. Os autores observaram, por meio de cristalografia de raio-X, uma alta mobilidade da tampa, entre os estados aberto e fechado, de lipase de *Humicola lanuginosa*, *Penicillium camembertii* e *Rhizopus delemar* em meio aquoso, o que levou a questionar se haveria mais dois estágios para a “teoria da enzima”. A mudança conformacional é essencial para a máxima atividade enzimática, mas não explicaria a atividade observada em meio aquoso (**Figura 10**).

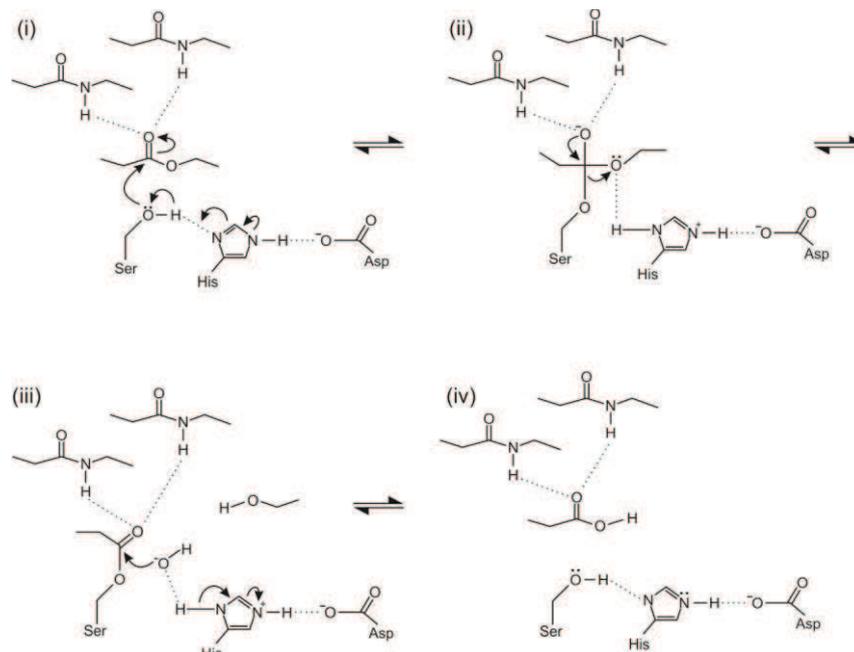
Embora diversas estruturas de lipase de diferentes espécies já sejam conhecidas, os detalhes do mecanismo pelo qual ocorre a abertura da “tampa”, ainda permanecem desconhecidos. Estudos recentes revelaram que a presença da “tampa” não está correlacionada com a ativação interfacial de todas as lipases. Lipases produzidas por *Burkholderia glumae*, *Candida Antarctica B* e *Pseudomonas aeruginosa*, embora possuam a “tampa” em sua estrutura não apresentam ativação interfacial (CASTRO et al., 2004). Já em outras lipases como as produzidas por *Penicillium purpurogenum*, *Streptomyces exfoliatus*, *Bacillus subtilis* e *Fusarium solani* a “tampa” está ausente (NARDINI; DIJKSTRA, 1999; SALAMEH; WIEGEL, 2007a).

2.3.3 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação de lipase se inicia com o ataque do átomo de oxigênio do grupo -OH da serina nucleofílica sobre o carbono da carbonila da ligação lipídeo-éster (**Figura 11**). Um intermediário transitório tetraédrico é formado, o qual é caracterizado pela carga negativa sobre o oxigênio ligado a carbonila, em que ocorre o rompimento da ligação éster e a ligação de quatro átomos ao carbono da carbonila, formando uma estrutura tetraédrica. O intermediário é estabilizado pela ligação hidrogênio entre o átomo de oxigênio da carbonila negativamente carregado, o oxianion, e entre pelo menos dois grupos -NH peptídicos da cavidade do oxianion. A reatividade do nucleófilo serina é aumentada pela histidina do sítio catalítico, para a qual é transferido um próton do grupo -OH da serina. A transferência desse próton é facilitada pela presença do ácido catalítico, Asp/Glu, que orienta precisamente o anel de imidazol da histidina e, parcialmente, neutraliza a sua carga. Subseqüentemente, o próton é doado ao oxigênio da ligação éster, que é então clivada. Neste estágio, o componente ácido do substrato é esterificado à serina nucleofílica, intermediário covalente, enquanto que o

componente álcool se difunde no meio. Em seguida, ocorre a etapa de desacilação, em que uma molécula de água hidrolisa o intermediário covalente. A histidina, localizada no sítio ativo, ativa essa molécula de água pela ligação a um de seus prótons. O íon resultante OH⁻ ataca o átomo de carbono da carbonila do grupo acil covalentemente ligado a serina. Novamente, forma-se um intermediário tetraédrico negativamente carregado, o qual é estabilizado pelas interações com a cavidade oxiânion. A histidina doa um próton para o átomo de oxigênio do resíduo de serina ativa, liberando o componente acil como ácido graxo e a enzima, que pode iniciar uma nova catálise (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

Figura 11: Mecanismo de reação de lipase. (i) Ligação do lipídeo, ativação do resíduo de serina pela histidina e ataque nucleofílico ao átomo de carbono carbonílico do substrato pelo oxigênio da serina. (ii) Formação do intermediário transitório tetraédrico, com estabilização do oxigênio por ligações de hidrogênio com dois grupos -NH peptídicos. A histidina doa um próton para o componente álcool que sai do substrato. (iii) O intermediário covalente (acil enzima), no qual o componente ácido do substrato é esterificado ao resíduo serina da enzima. A entrada da molécula de água é ativada pelo resíduo de histidina, e a hidroxila resultante realiza um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do intermediário covalente. (iv) O resíduo de histidina doa um próton ao átomo de oxigênio do resíduo de serina ativo, a ligação éster entre a serina e o componente acil é quebrada, e o produto acil é liberado como ácido carboxílico.



Fonte: (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

2.4 Fontes de produção de lipase

Uma vez que as lipases são enzimas onipresentes, podendo ser encontradas em plantas, animais e micro-organismos (SALLEH; RAHMAN; BRASI, 2006) é de se esperar que essas enzimas apresentem diferentes tamanhos e formas. Há desde enzimas tão pequenas

quanto 19,4 kDa à estruturas oligoméricas acima de 300 kDa com cada subunidade possuindo massa molecular de aproximadamente 50 kDa. Atualmente, são conhecidas 8 classes de lipases (SALAMEH; WIEGEL, 2007a; SALLEH; RAHMAN; BRASI, 2006). Os micro-organismos são as fontes preferenciais para produção em escala industrial, já que apresentam maior simplicidade na manipulação genética, facilidade de preservação, grande variedade catalítica, alta produtividade, e rápido crescimento em meios de cultura de baixo custo (FERRAREZI, 2011; FREIRE; CASTILHO, 2008; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006a).

2.5 Produção de lipases por micro-organismos

Independente de suas vantagens e desvantagens, aproximadamente 90% de todos os biocatalisadores industriais são produzidos por algum tipo de bioprocessamento submerso (SmF) em meios de cultivos otimizados, utilizando micro-organismos geneticamente modificados. Esse processo pode oferecer vantagens sobre métodos de bioprocessamento em estado sólido (SSF) (CONTESINI et al., 2010; HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004). O bioprocessamento em estado sólido (SSF) exige menos equipamentos ou sistemas de controle, economiza espaço para o bioprocessamento, utiliza menos água, possui rendimentos superiores e demanda menos energia comparado ao bioprocessamento submerso (SmF). Além disso, possibilita a aplicação de resíduos sólidos como fontes de carbono e indutores. No entanto, o bioprocessamento em estado sólido possui limitações, dentre elas está a incapacidade de alguns micro-organismos em crescer sob condições de umidade reduzida e o controle de parâmetros essenciais no processo de otimização da produção da enzima (CONTESINI et al., 2010).

Diferentes parâmetros como fontes de carbono e nitrogênio, pH inicial, meio mineral, inóculo, agitação/aeração e temperatura geram uma diversidade de estratégias, que podem ser empregadas para aumentar a eficiência na produção de lipases microbianas (COLIN; BAIGORI; PERA, 2010; DALMAU et al., 2000; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006b; KAUSHIK et al., 2010). Há dois métodos de se avaliar a influência desses parâmetros sobre a resposta. O método “um fator por vez” (*one-factor-at-time - OFAT*) analisa um parâmetro por vez, enquanto os outros estão fixos, e o método “planejamento experimental” (*design of experiments - DOE*), em que se analisa todos os parâmetros de uma só vez. As vantagens de adotar o método de planejamento experimental estão na possibilidade de otimizar as condições de cultivo, analisando as interações entre os parâmetros utilizados com um número reduzido de experimentos, o que leva a uma economia de tempo e reagentes (CZITROM, 1999).

2.5.1 Fatores nutricionais

Estudos sobre a fisiologia da produção de lipase mostrou que, os mecanismos que regulam a biossíntese variam muito em diferentes micro-organismos. As fontes de carbono são os indutores mais importantes para a obtenção dessas enzimas. Pode-se, utilizar um mix contendo fontes de fácil assimilação (e.g., glicose, sacarose) com fontes indutoras (e.g., óleos vegetais, estéres de ácidos graxos) ou apenas fontes indutoras (DALMAU et al., 2000; DARVISHI et al., 2011; FERRER et al., 2001; NAHAS, 1988). Os óleos vegetais são os mais utilizados para produção de lipase, principalmente, os que apresentam altas concentração de ácido oleico (C_{18:1}), considerado o melhor indutor para a produção de lipase (DALMAU et al., 2000; FERRER et al., 2001). A **Tabela 1** apresenta a composição em ácidos graxos de cada óleo utilizado neste estudo. Almeida; Taulk-Tornisielo; Carmona, (2012) testaram diversas fontes de carbono para a produção de lipase por *Candida viswanathii*. Os meios foram suplementados com carboidratos, álcoois, ácidos orgânicos, ácidos graxos e triacilglicerois para verificar a produção de lipase e o crescimento celular. O melhor indutor foi o ácido oleico ($6,75 \pm 0,75$ U ml⁻¹). Quando foi avaliada a influência de óleos naturais, o óleo de oliva apresentou a melhor produção de lipase ($58,50 \pm 5,25$ U mL⁻¹).

Diferentes fontes de nitrogênio, orgânicas e inorgânicas, são usadas para crescimento dos fungos e podem interferir na produção de lipases. O nitrogênio é utilizado pelas células para biossíntese de aminoácidos, biossíntese e metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos (MOAT; FOSTER, 1988). Fontes inorgânicas podem ser usadas rapidamente pelas células, enquanto que fontes orgânicas podem suprir as células com inúmeros fatores de crescimento e amino ácidos, que são necessários ao metabolismo e a síntese de proteínas (TAN et al., 2004).

Fickers et al. (2004) testaram diferentes fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas sobre a produção de lipase pela levedura *Yarrowia lipolytica* geneticamente modificada. A maior atividade enzimática foi observada com triptona N1 como fonte de carbono. Para confirmar a influência dessa fonte, os autores determinaram a produção de lipase através da atividade enzimática, crescimento celular e expressão do gene LIP2, em meios contendo duas fontes de carbono diferentes, óleo de oliva e glicose, suplementado com concentrações crescentes de triptona N1. Em ambos os meios, a atividade enzimática aumentou de acordo com o aumento da concentração de triptona N1, com destaque para o meio contendo óleo de oliva, em que o micro-organismo produziu dez vezes mais do que no meio contendo glicose. A expressão do gene também aumentou de acordo com o aumento das concentrações de

triptona N1. Burkert; Maugeri; Rodrigues (2004) estudaram o efeito de fontes de carbono (glicose, óleo de soja e oliva) e fonte de nitrogênio (água de maceração de milho e nitrato de amônio (NH_4NO_3) sobre a produção de lipase por *Geotrichum* sp., usando métodos estatísticos de planejamento experimental. A produção máxima foi de 20 U mL^{-1} com concentrações de 2,1-2,5% de nitrato de amônio, 13,0-15,0% de água de maceração de milho e 0,6% de óleo de soja.

Tabela 1: Composição em ácidos graxos de óleos vegetais.

Ácido graxo ^a	Óleos vegetais		
	Oliva	Soja	Girassol
Saturado			
C _{14:0} mirístico	-	0,06	0,06
C _{16:0} palmítico	10,84	9,90	5,70
C _{17:0} margárico	0,14	0,10	0,04
C _{18:0} esteárico	3,59	3,94	4,79
C _{20:0} araquídico	0,50	0,41	0,30
C _{22:0} bénico	0,15	0,48	1,16
C _{24:0} lignocérico	0,06	0,21	0,31
Total	15,28	15,10	12,36
Insaturado			
C _{16:1} palmitoléico	0,92	0,08	-
C _{17:1} miristoléico	0,21	0,08	0,06
C _{18:1} oleico	75,55	21,35	15,26
C _{18:2} linoléico	7,01	56,02	71,17
C _{18:3} linolênico	0,66	7,15	0,45
C _{20:1} gadoléico	0,32	0,22	0,22
C _{20:2} eicosadienóico	-	-	0,09
C _{22:2} docosadienóico	0,05	-	-
C _{24:1} nervónico	-	-	0,39
MUFA^b	77,00	21,73	15,93
PUFA^c	7,72	63,17	71,71

^a Composição em porcentagem de ácidos graxos.

^b MUFA = Total de ácidos graxos monoinsaturado.

^c PUFA = Total de ácido graxo poliinsaturado.

Fonte: (ZAMBIAZI et al., 2007) modificado.

2.6 Purificação e caracterização bioquímica de lipases

Com relação à produção industrial das enzimas, um dos principais entraves está associado com os métodos de purificação, que elevam o valor do produto tornando-o economicamente inviável. Isto tem levado os pesquisadores a focarem suas pesquisas na

obtenção de métodos mais simples e econômicos com o objetivo de viabilizar a produção de enzimas em larga escala.

Os processos de purificação de proteínas produzidas por micro-organismos constituem uma etapa complexa na obtenção de produtos biotecnológicos. Cada meio de cultura ou uma simples modificação de uma variável, em um meio previamente estabelecido, pode modificar as características, resultando na necessidade de um novo processo de purificação. Dentre essas características, pode-se citar a elevada proporção de água, a presença de moléculas orgânicas e inorgânicas constituintes do meio de cultura, metabólitos extracelulares distintos da molécula que será purificada, bem como metabólitos intracelulares oriundos de células mortas e fragmentos celulares, o que torna a etapa de purificação tão ou mais desafiante que a etapa de cultivo e otimização (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Proteínas intracelulares tornam o processo de purificação mais trabalhoso e oneroso comparado a proteínas extracelulares geralmente secretadas por fungos filamentosos. A demanda de rompimento das células para obtenção das enzimas intracelulares, torna o meio mais viscoso e rico em contaminantes, como nucleotídeos, proteínas não-alvo e demais moléculas intracelulares (PESSOA; KILIKIAN, 2005), fato que dificulta e eleva os custos de purificação, reduzindo a competitividade da enzima no mercado.

Não há processos de purificação de aplicação geral, entretanto, a purificação pode ser dividida em quatro etapas genéricas: clarificação, separação/concentração das moléculas, purificação de alta resolução e operações de acondicionamento final do produto (PESSOA; KILIKIAN, 2005). Aires-Barros, Taipa e Cabral (1994) descreveram uma série de estratégias adotadas para purificação de lipase, seja de origem microbiana, animal ou vegetal. Os autores ressaltaram os vários procedimentos envolvidos em série para obtenção de um máximo grau de pureza, reforçando a tese de que não há métodos de purificação específicos e de que são necessários uma ou mais etapas em série envolvendo diferentes técnicas.

Yadav et al. (2011) purificaram uma lipase produzida por *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639 utilizando ultra-filtração, seguida de cromatografia de troca iônica e filtração em gel. Os autores obtiveram uma lipase com massa molecular de 400 kDa, após análise em SDS-PAGE, a massa molecular correspondeu a 20 kDa, indicando uma estrutura oligomérica com 20 subunidades. Palomo et al. (2004a) purificaram a lipase produzida por *Bacillus thermocatenuatus* (BTL2) clonada em *Escherichia coli* utilizando o mecanismo de ativação interfacial das lipases. Essa propriedade faz com que as enzimas sejam adsorvidas em um suporte hidrofóbico (octil agarose), seguido pela desorção com apenas 0,2% de Triton X-100.

Palomo et al. (2004b) utilizaram as propriedades de formação de agregados biomoleculares da lipase produzida por *Pseudomonas fluorescens* (PFL), para desenvolver uma ferramenta eficiente para purificação de lipases. A hipótese dos autores consistiu na imobilização dessa lipase a um suporte, neste caso glioxil-agarose, de forma que o sítio ativo ficasse exposto ao meio, permitindo a adsorção por agregação biomolecular apresentada por outras lipases, como as produzidas por *Bacillus therothocatenulatus* (BTL 2), *Rhizomucor miehei* (RML), *Rhizopus oryzae* (ROL), e *Humicola lanuginosa* (HLL) (atualmente denominado *Thermomyces lanuginosa*). A dessorção foi feita com baixas concentrações de detergente.

As propriedades bioquímicas das lipases tem sido extensivamente relatadas, especialmente aquelas relacionadas às aplicações industriais. As propriedades gerais das lipases microbianas, incluem massa molecular, ponto isoelétrico (pI), pH e temperatura ótimos e estabilidade. Os efeitos de vários fatores sobre a atividade, estabilidade e especificidade dessas enzimas, como substrato, especificidade posicional, efeitos de íons metálicos, surfactantes e inibidores, atividade e estabilidade em solventes orgânicos podem determinar sua adequação para o uso em diferentes ambientes e indústrias (ALMEIDA, 2012).

2.7 Importância e aplicação das lipases

O mercado de enzimas está inserido no contexto da bioeconomia, em que a produção otimizada por micro-organismos apresenta uma solução economicamente viável, pois tende a substituir produtos sintéticos por produtos biodegradáveis e renováveis (SÁ-PEREIRA et al., 2008), com a redução dos custos do produto, uma vez que substitui múltiplas etapas do processo químico por processos biotecnológicos mais eficientes, de menor consumo energético e impacto ambiental.

As principais enzimas industriais são as proteases e amilases, com 25,0% e 15,0% do mercado respectivamente, no entanto, as lipases vêm ganhando cada vez mais destaque (SÁ-PEREIRA et al., 2008). Isso ocorre, principalmente, devido às suas propriedades de enantiosseletividade, regioseletividade, quimiosseletividade e ampla especificidade pelo substrato (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; SÁ-PEREIRA et al., 2008), levando a obtenção de produtos com alto valor agregado (SÁ-PEREIRA et al., 2008). As lipases possuem aplicabilidade em diversos setores industriais:

Indústria têxtil: O uso em indústria têxtil começa a ganhar importância. As lipases são usadas para auxiliar a remoção de lubrificantes, a fim de melhorar a absorção do corante ao

tecido, e para dar características a peças de tecido poliéster como maciez, alta resistência, capacidade de lavagem, abrasão química e resistência a rugas (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Indústria de detergentes: O mais importante campo de aplicação comercial para lipases fúngicas é como aditivos em detergentes em lavanderia industrial e detergentes domésticos. Sua utilização reduz descarte de detergentes no ambiente, uma vez que o volume necessário para a mesma lavagem é inferior, e reduz o consumo de energia, permitindo uma lavagem a uma temperatura inferior (CASAS-GODOY et al., 2012; MAIA et al., 1999; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Em 1994, a Novo Nordisk lançou a primeira lipase comercial, chamada Lipolase, obtida do fungo *Thermomyces lanuginosus* e expresso em *Aspergillus oryzae*. Já em 1988 a mesma empresa havia utilizado técnicas moleculares para expressar uma lipase naturalmente produzida por uma estirpe de *Humicola* em *Aspergillus oryzae* capaz de hidrolisar nódos de gorduras (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Indústria alimentícia: Na indústria alimentícia e de bebidas, as lipases são utilizadas para melhorar o sabor, aroma, prolongar a conservação e até mesmo reduzir o teor de gorduras e aparência de alimentos, como carnes, queijos, leite e margarinas (CASAS-GODOY et al., 2012; CAVALCANTI et al., 2005; CHOI; HWANG; KIM, 2003; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Indústria papeleira e de couro: Nessas indústrias, as lipases são utilizadas como catalisadores de reações de hidrólise, no controle do “pich”, para remoção de triacilgliceróis e ceras. Além disso, sua presença aumenta a brancura e reduz a poluição nas águas residuais (CASAS-GODOY et al., 2012; JOSEPH et al., 2007; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

(iv) Indústria química e farmacêutica: Nesses setores, as lipases atuam como catalisadores de reações para obtenção de compostos e lipídeos específicos, na síntese de surfactantes, auxiliar em medicamentos para dietas, obtenção de enantiômeros puros através da resolução de misturas racêmicas (CASAS-GODOY et al., 2012; FERRER et al., 2000; HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Indústria de cosméticos: Nessas indústrias, as lipases são utilizadas como agente umidificante, surfactantes, aromas, e como emolientes em produtos de cuidados pessoais (CASAS-GODOY et al., 2012; SAVITHA et al., 2007; SAXENA et al., 1999). Mono e diacilglicerol são produzidos pela esterificação de gliceróis e são usados como surfactantes em cosméticos e perfumes (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Tratamento de resíduos: No tratamento prévio de efluentes, as lipases hidrolisam óleos e gorduras e uma ampla série de resíduos industriais, prolongando a vida útil das tubulações. Os exemplos incluem: tratamento de esgoto, limpeza de tanques, fossas sépticas e caixas de gordura, (CASAS-GODOY et al., 2012; MENDES et al., 2005; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Tabela 2: Fontes comerciais de lipases microbianas e suas principais aplicações industriais.

Micro-organismo	Aplicação	Nome comercial	Empresa
<i>Humicola lanuginosa</i>	Aditivo em detergente	Lipolase TM	Novo Nordisk
<i>Candida cylindracea</i>	Processamento de alimentos	ChiroCLEC-CR Lipase AY Lipase MY, Lipase OF-360 Chirazyme® L-3 Lipomod™ 34P-L034P	Atlas Biologics Amano Meito Sangyo Boehringer Mannheim Biocatalysts
<i>Candida rugosa</i>	Síntese orgânica	Lipase AY "Amano" 30 Resinase®	Amano Novozymes
<i>Rhizomucor miehei</i>	Processamento de alimentos	Palatase®	Novozymes
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Aditivo em detergente	Lipolase®, Lipolase® Ultra, Lipo Prime™, Lipex®	Novozymes
<i>Aspergillus niger</i>	Processamento de alimentos	Lipase A "Amano" 6 Lypolyse NA	Amano Lyven
<i>Rhizopus oryzae</i>	Processamento de alimentos, oleoquímica	Lipase F-AP15 Lipomod™ 627P-L627P	Amano Biocatalysts
<i>Rubus niveus</i>	Oleoquímica	Newlase F	Amano
<i>Mucor miehei</i>	Processamento de alimentos	Piccnate	Gist-Brocades Novo Nordisk
<i>Mucor javanicus</i>	Processamento de alimentos, oleoquímica	Lipase M "Amano" 10	Amano
<i>Penicillium roquefortii</i>	Processamento de alimentos	Lipomod™ 338P-L338P	Biocatalysts
<i>Penicillium camemberti</i>	Processamento de alimentos, oleoquímica	Lipase G "Amano" 50	Amano
<i>Penicillium</i> sp.	Processamento de alimentos	Lipomod™ 621P-621L	Biocatalysts
<i>Candida antarctica</i> A/B	Síntese orgânica	Chirazyme® L-5 SP526 Chirazyme® L-2 SP 525 ot Novozyme 435b	Boehringer Mannheim Nova-nordisk Boehringer Mannheim Nova-nordisk
<i>Geotrichum candidum</i>	Oleoquímica	Chirazyme® L-8 SP 524, Lipolase®	Boehringer Mannheim Nova-nordisk

Fonte: (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012)

3 OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem como objetivo geral, estudar a produção de lipases por seis fungos de origem marinha.

Objetivos específicos

- Refinar a identificação taxonômica das seis linhagens previamente selecionadas como melhores produtores de lipase;
- Selecionar o melhor produtor de lipase dentre os seis fungos lipolíticos isolados de invertebrados marinhos da costa brasileira;
- Avaliar a influência de diferentes fatores na produção de lipase pelo fungo selecionado, visando otimização do processo de produção;
- Purificar e caracterizar parcialmente bioquimicamente a principal lipase produzida pelo fungo selecionado, cultivado em condições otimizadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Foram utilizados no presente trabalho 6 fungos filamentosos lipolíticos, previamente isolados e selecionados por Alexandre Kopte Garcia (**Tabela 3**) sob a orientação da Profa. Dra. Lara Sette. Os fungos foram recuperados de diferentes amostras de invertebrados marinhos, coletados na costa norte do Estado de São Paulo no âmbito do Projeto Fapesp 2005/60175-2 intitulado “Descoberta e desenvolvimento de potenciais agentes quimioterápicos a partir de invertebrados marinhos e de microrganismos associados” e coordenado pelo Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck (IQ-USP/SC). Os fungos foram depositados na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) do CPQBA/UNICAMP.

Tabela 3: Dados referentes aos isolados com melhores resultados de atividade lipolítica em pH 8,0 e 6,0: número de acesso na CBMAI, dados taxonômicos e de origem.

Número de acesso	ID Molecular	ID Morfológica	ID Final	Amostra de origem ^a	U pH 8,0	U pH 6,0
CBMAI 1227	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	ML	23,1	0,7
CBMAI 1228	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>	DR	12,7	2,1
CBMAI 1229	ND	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	PC	12,2	3,0
CBMAI 1230	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	DR	2,9	0,5
CBMAI 1231	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>	DR	2,1	0,5
CBMAI 1232	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> cf. <i>niger</i>	<i>Aspergillus</i> cf. <i>niger</i>	DR	1,7	2,4

^a ML= *Mycale laxissima*; DR=*Drasmodon reticulatum*; PC= *Petromica citrina*; Dsp= *Didemnum* sp. ND: Não determinado.

Fonte: (GARCIA, 2010)

4.2 Identificação taxonômica dos fungos filamentosos

Os seis fungos lipolíticos foram identificados previamente utilizando características morfológicas e dados advindos do sequenciamento da região ITS. No presente estudo, as identificações foram refinadas com base em outros marcadores moleculares. Para tanto, o DNA foi extraído com o detergente catiônico CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio), utilizando o método modificado por Gerardo et al. (2004). Os fragmentos provenientes da

raspagem do micélio do fungo cultivado em meio ágar batata dextrose (BDA) foram inseridos em microtubos de 1,5 mL. Em seguida foi adicionado microesferas de vidro, 500,0 µL de tampão de lise TES (Tris 100 mM; EDTA 10 mM; SDS 2,0%; pH 8,0) e 5,0 µL de proteinase K (20,0 mg mL⁻¹), a suspensão foi misturada com auxílio do vortex durante 4 minutos e incubada em Banho-Maria a 65 °C durante 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 140,0 µL de NaCl 5 M, 64,0 µL de CTAB 10,0% e incubado em Banho-Maria a 65 °C por 60 minutos, seguido de agitação em vortex durante 4 minutos. Após esse período, o material foi centrifugado a 9.400 x g por 30 segundos e foi adicionado 600,0 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), homogeneizado e centrifugado a 13.500 x g durante 10 minutos. Em seguida, foi coletado aproximadamente 500,0 µL do sobrenadante e transferido a outro microtubo de 1,5 mL contendo 300,0 µL de isopropanol 100% resfriado e 50,0 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,2, homogeneizado e centrifugado a 9.400 x g durante 10 minutos. Após a remoção do isopropanol por inversão única dos microtubos foi adicionado 600,0 µL de etanol 70,0% para desidratação e centrifugado a 9.400 x g durante 10 minutos, em seguida, o etanol foi removido por inversão única. Finalmente, após a remoção do sobrenadante, os microtubos foram deixados abertos em repouso *overnight*, para secagem, e o DNA genômico ressuspendido em tampão TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM) e armazenado a -20 °C.

Os DNAs genômicos foram utilizados como molde para a amplificação dos seguintes marcadores alvo: espaçador interno transcrito (ITS1-5.8S-ITS2), fator de alongação α (*tef*) ou o gene que codifica para a β -tubulina. Os *amplicons* foram obtidos pela reação da polimerase em cadeia (PCR) em termociclador Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf). As reações foram preparadas em volume final de 25,0 µL, as quais continham: 2,0 µL de DNA (aproximadamente 20 ng); 1,0 µL de *primer* F (10,0 µM); 1,0 µL *primer* R (10,0 µM); 5,0 µL Buffer 5X, 2,0 µL MgCl₂ (25 mM); 4,0 µL dNTPs (1,25 mM cada); 1,0 µL de BSA (10 mg mL⁻¹) e 0,2 µL de Taq (U µL⁻¹).

A região ITS (compreendendo ITS1-5.8S-ITS2) foi amplificada utilizando os *primers* ITS1 (5' TCCGTAGGTAGAACCTGCGG 3') e ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'; WHITE et al., 1990) para o isolado pertencente ao gênero *Fusarium*. As condições da reação foram: desnaturação 94 °C por 3 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento 55 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2 minutos; seguido por resfriamento a 10 °C até retirada das amostras do termociclador.

Para os representantes do gênero *Trichoderma* foi amplificado o fator de alongação 1- α (*tef*), utilizando o par de *primers* EF1-728F (5' CATCGAGAAGTTCGAGAAGG 3')

(CARBONE; KOHN, 1999) e Tef1R (5' GCCATCCTTGGGAGATCACAG 3') (SAMUELS et al., 2002). As condições de PCR *touchdown* foram: desnaturação 95 °C por 2 minutos; 9 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 65 °C por 45 segundos, extensão a 70 °C por 1 minuto, reduzindo em 1°C a temperatura do anelamento a cada ciclo; seguido por 29 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 45 segundos, extensão a 70 °C por 1 minuto; extensão final a 70 °C por 5 minutos, seguido por resfriamento a 10 °C até retirada das amostras do termociclador.

Para os representantes do gênero *Aspergillus*, foi utilizado como marcador taxonômico o gene da β -tubulina (BenA), o qual foi amplificado pelo par de *primers* F-Bt2a (5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC3') e R-Bt2b (5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3') (GLASS; DONALDSON, 1995). As condições de PCR foram: desnaturação 94 °C por 3 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento 58 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 2 minutos; seguido por resfriamento a 10 °C até retirada das amostras do termociclador.

Todos os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% e, posteriormente, corados com GelRed 1:500 (Biotium) e fotografados em transiluminador Gel Logic 212 PRO (Carestream). Após a amplificação, as amostras foram purificadas com o kit Wizard® SV Gel (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

O sequenciamento das amostras resultantes da amplificação foi realizado com BigDye Terminator v3.1™ (Life Technologies) seguindo as instruções do fabricante. Os mesmos *primers* usados na amplificação foram utilizados nas reações de sequenciamento. As sequências *forward* e *reverse* foram obtidas com ABI3130 Genetic Analyser (Life Technologies). As sequências obtidas foram editadas com BioEdit v7.2.5 (HALL, 1999). Os contigs gerados para os fungos dos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus* foram usados para pesquisar sequências homólogas no banco de dados do NCBI – GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para a identificação das espécies do gênero *Trichoderma*, os contigs foram contrastados no banco de dados *Trichokey* (<http://www.isth.info>), considerado a ferramenta *barcode* para identificação de espécies pertencentes a esse gênero (DRUZHININA et al., 2005).

As sequências homólogas obtidas no GenBank foram utilizadas para inferir as árvores filogenéticas para linhagens do gênero *Aspergillus* (**Figura 12** e **Figura 13**). O alinhamento das sequências foi realizado com o *software* MAFFT versão 7 (KATO; STANDLEY, 2013). As análises filogenéticas das sequências foram realizadas no *software* MEGA v.6 (TAMURA

et al., 2013) utilizando o método de máxima verossimilhança. O modelo de substituição nucleotídica utilizado foi o Kimura 2-parâmetros com distribuição gamma entre os sítios. Para avaliar a confiabilidade da topologia, 1.000 réplicas de *bootstraps* foram realizadas. Todos as lacunas foram excluídos da análise. *Aspergillus leporis* CBS 151.66, *Aspergillus togoensis* CBS 272.89, *Aspergillus coremiiformis* CBS 553.77, *Aspergillus coremiiformis* e *Aspergillus violaceofuscus* CBS 123.27 foram usados como grupo externos durante a análise das sequências de β -tubulina.

4.3 Preservação dos fungos filamentosos de origem marinha

Cópias dos seis fungos filamentosos citados na **Tabela 3** foram trazidas da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) do CPQBA/UNICAMP para a Central de Recursos Microbianos do Instituto de Biociências da UNESP campus Rio Claro (CRM-UNESP), onde foram preservadas em duplicata e em dois diferentes métodos de preservação: Castellani (em água destilada a 4 °C) e ultracongelamento a -80 °C (em glicerol 20,0%)

4.4 Preparação do inóculo

Os fungos cresceram em tubo de cultivo inclinado com meio ágar-aveia (g L⁻¹: ágar 20,0; aveia 40,0), durante 10 dias a 28 °C. Em seguida, foi realizado uma suspensão de conídios e inoculado 1,0 mL aos meios de cultura anteriormente citados.

A suspensão de células correspondeu a 1,0 a 2,0 x 10⁷ conídios mL⁻¹ e inoculado 1 mL aos meios de cultura acima citados.

4.5 Esterilização do meio de cultivo

Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave por 20 minutos, a 120 °C, 1 ATM.

4.6 Obtenção do filtrado de cultura

Após o crescimento, o micélio foi separado do extrato bruto por filtração a vácuo. O meio foi centrifugado a 15.400 x g por 15 minutos, filtrado e lavado com álcool, para remoção de óleo residual. O extrato bruto foi utilizado para dosagem de atividade enzimática,

quantificação de proteínas, caracterização e purificação. Enquanto que a massa celular foi utilizada para determinar a massa seca.

4.7 Seleção do melhor fungo marinho produtor de lipase

Os seis fungos filamentosos lipolíticos utilizados no presente trabalho (**Tabela 3**) foram submetidos aos ensaios de produção de lipase em condição não salina (água destilada, água d) e salina (adição de cloreto de sódio, NaCl 3,0% m/v ou de água do mar artificial, ASW). Foi utilizado o meio mineral de Vogel (1956) (g L^{-1}): $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 50; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50; $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2,5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05; H_3BO_3 0,05; Na_2MoO_4 250; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 150; KH_2PO_4 250; NH_4NO_3 100; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5 e biotina (5 mg mL^{-1}), suplementado com 2,0% (v/v) de óleo de oliva e 0,2% (m/v) de extrato de levedura. O pH foi ajustado a 8,0. Frascos Erlenmeyer (125 mL) foram utilizados para acondicionar 25 mL dos meios de cultura. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A ASW foi preparada de acordo com Vita-Marques et al. (2008) contendo (g L^{-1}): $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 11,91; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,66; $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,022; NaCl 26,319; Na_2SO_4 4,409; KCl 0,745; NaHCO_3 0,216; KBr 0,108; H_3BO_3 0,029.

4.8 Determinação inicial do tempo de cultivo

Os dois isolados selecionados como os melhores produtores de lipase nas condições estudadas (**item 4.7**) tiveram suas curvas de crescimento determinadas visando a determinação do tempo de cultivo inicial, de acordo com o abaixo descrito:

4.8.1 Curva de crescimento de *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229

Os ensaios foram preparados em triplicata em água destilada, conforme descrito no **item 4.7**. A suspensão de células correspondeu a $1,4 \times 10^7$ conídios mL^{-1} e inoculado 1 mL ao meio cultura. O tempo de cultivo total foi de 144 horas, sendo que, a cada 24 horas foram retirados 3 ensaios para separar a biomassa do extrato bruto.

4.8.2 Curva de crescimento de *Aspergillus cf. tubingensis* CBMAI 1232

Os ensaios foram preparados em triplicata em água destilada, conforme descrito no **item 4.7**. A suspensão de células correspondeu a $1,6 \times 10^7$ conídios mL^{-1} e inoculado 1 mL ao

meio cultura. O tempo de cultivo total foi de 144 horas, sendo que, a cada 24 horas foram retirados 3 ensaios para separar a biomassa do extrato bruto.

4.9 Seleção do meio mineral para produção de lipase

Os dois fungos selecionados no **item 4.7** foram cultivados em duplicata com o meio básico água destilada em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio de cultura, com os meios minerais descritos abaixo, para testar a produção de lipase. Os ensaios foram suplementados com 0,2% (m/v) de extrato de levedura e 2,0% (v/v) de óleo de oliva, o pH foi ajustado a 8,0. A suspensão de células correspondeu a $1,3 \times 10^7$ conídios mL⁻¹ de *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229 e $1,25 \times 10^7$ conídios mL⁻¹ de *Aspergillus cf. tubingensis* CBMAI 1232. Após a inoculação dos meios, os mesmos foram cultivados a 25 °C, com agitação orbital de 150 rpm, por um período de 144 horas.

- **Meio de cultivo 1, modificado:** (g L⁻¹) MgSO₄•H₂O 0,14; K₂HPO₄ 0,5; com substituição de CaCO₃ 5,0 por CaCl₂•2H₂O 7,2 (KASHMIRI; ADNAN; BUTT, 2006);
- **Meio de cultivo 2:** (g L⁻¹) NaH₂PO₄ 12,0; KH₂PO₄ 2,0; CaCl₂•2H₂O 0,03; ZnSO₄•7H₂O 0,03; FeSO₄•7H₂O 0,005 (ÜLKER et al., 2011);
- **Meio de cultivo 3:** (g L⁻¹) NaH₂PO₄ 12,0; KH₂PO₄ 2,0; MgSO₄•H₂O 0,168; CaCl₂•2H₂O 0,331 (RIFAAT et al., 2010);
- **Meio de cultivo 4:** (g L⁻¹) KH₂PO₄ 1,0; MgSO₄•H₂O 1,123; CuSO₄ 0,06 (PERA et al., 2006);
- **Meio de cultivo 5, modificado:** (g L⁻¹) MgSO₄•H₂O 0,28; KCl 0,5; K₂HPO₄ 2,0; com adição de FeSO₄•7H₂O 0,005; NaH₂PO₄ 2,0; CaCl₂•2H₂O 0,5 (ADHAM; AHMED, 2009);
- **Meio de cultivo 6, modificado:** (g L⁻¹) K₂HPO₄ 2,0; MgSO₄•H₂O 0,562; com substituição de CaCO₃ 5,0 por CaCl₂•2H₂O 7,2; e adição de FeSO₄•7H₂O 0,005 (ADHAM; AHMED, 2009);
- **Meio de cultura 7:** (g L⁻¹) Na₂HPO₄ 7,0; CaCl₂•2H₂O 0,5; NaCl 0,25; MgSO₄•H₂O 1,684; KH₂PO₄ 3,0 (ADHAM; AHMED, 2009);
- **Meio de cultura 8:** (g L⁻¹) KH₂PO₄ 2,0; KCl 0,5; MgSO₄•H₂O 0,314 (ADHAM; AHMED, 2009);

- **Meio de cultura 9:** (g L⁻¹) KH₂PO₄ 1,0; MgSO₄ 0,229; CuSO₄ 0,06; CaCl₂•2H₂O 0,662; FeCl₃•6H₂O 1,665 (COLIN; BAIGORÍ; PERA, 2011);
- **Meio de cultura 10:** (g L⁻¹) KH₂PO₄ 1,0; MgSO₄•H₂O 0,281; CaCl₂•H₂O 0,132; NaCl 0,1; H₃BO₃ 0,0005; CuSO₄•5H₂O 0,00004; KI 0,0001; FeCl₃•6H₂O 0,00023; ZnSO₄•7H₂O 0,0004; MnSO₄•H₂O 0,0004 (OLSON; JOHNSON, 1948);
- **Meio de cultura 11:** (g L⁻¹) MgSO₄•H₂O 0,28; ZnSO₄•7H₂O 0,4; FeSO₄•7H₂O 1,829; MnSO₄•H₂O 0,122 (GOCHEV et al., 2012);
- **Meio de cultura 12, modificado:** Meio 11 com adição de CaCl₂•2H₂O 0,5 (GOCHEV et al., 2012);
- **Meio de cultura 13:** (g L⁻¹) C₆H₈O₇•H₂O 50,0; ZnSO₄•7H₂O 50,0; Fe(NH₄)₂(SO₄)₂•6H₂O 10,0; CuSO₄•5H₂O 2,5; MnSO₄•H₂O 0,05; H₃BO₃ 0,05; Na₂MoO₄ 0,05; Na₃C₆H₅O₇•5H₂O 150,0; KH₂PO₄ 250,0; NH₄NO₃ 100,0; MgSO₄•7H₂O 10,0; CaCl₂•2H₂O 5,0; biotina (5,0 mg mL⁻¹) (VOGEL, 1956).

4.10 Avaliação de diferentes parâmetros na produção de lipase pelo fungo *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229

Para a avaliação de diferentes fatores na produção de lipase pelo fungo *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229 foi utilizado o planejamento experimental seguido da análise dos dados estatísticos em *software* Statisitca 8,0 StatSoft Inc. (2300 East 14 th Street Tusla, OK 74 104, USA). Para tanto, o nível de confiança foi fixado em 90,0% por se tratar de material biológico (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Durante todo o processo de otimização foi utilizado o meio mineral Olson; Johnson (1948) sem salinidade (em água destilada) (g L⁻¹): KH₂PO₄ 1,0; MgSO₄•H₂O 0,281; CaCl₂•H₂O 0,132; NaCl 0,1; H₃BO₃ 0,0005; CuSO₄•5H₂O 0,00004; KI 0,0001; FeCl₃•6H₂O 0,00023; ZnSO₄•7H₂O 0,0004; MnSO₄•H₂O 0,0004.

4.10.1 Planejamento experimental: Plackett & Burman com 10 variáveis

No primeiro planejamento experimental foi utilizada a matriz Plackett & Burman de 16 ensaios com as seguintes variáveis independentes: diferentes concentrações de inóculo, óleo de oliva, óleo de girassol, óleo de soja, extrato de levedura, peptona, sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, nitrato de amônio NH₄NO₃, bem como agitação e pH. Os valores reais utilizados

nos ensaios deste planejamento estão apresentados na **Tabela 4**. Ao todo foram 19 ensaios, sendo 3 repetições no ponto central.

As suspensões de conídios (1 mL) nos valores estabelecidos na **Tabela 4** foram utilizadas para inocular os meios dos 19 ensaios da matriz P&B. Os meios foram incubados a 25 °C, por um período de 144 horas.

Tabela 4: Faixa dos valores estudados no planejamento experimental Plackett & Burman para estudo da produção de lipase por *T. harzianum* CBMAI 1229.

Variáveis	-1	0	1
X1. Inóculo (susp. conídios mL ⁻¹)	1,2 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁷	1,2 x 10 ⁸
X2. Óleo de oliva (% v/v)	0	1,0	2,0
X3. Óleo de girassol (% v/v)	0	1,0	2,0
X4. Óleo de soja (% v/v)	0	1,0	2,0
X5. Extrato de levedura (% m/v)	0	0,1	0,2
X6. Peptona (% m/v)	0	0,1	0,2
X7. Sulfato de amônio (% m/v)	0	0,1	0,2
X8. Nitrato de amônia (% m/v)	0	0,1	0,2
X9. Agitação orbital (rpm)	120	150	180
X10. pH	4,0	6,0	8,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.10.2 Planejamento experimental: Plackett & Burman com 7 variáveis

Os resultados do primeiro P&B foram utilizados como parâmetros para a estruturação de um segundo planejamento experimental P&B de 12 ensaios com as seguintes variáveis independentes: diferentes concentrações de óleo de soja, óleo de girassol, óleo de oliva, inóculo, extrato de levedura, peptona e pH. Os valores reais utilizados nos ensaios deste planejamento estão apresentados na **Tabela 5**. Ao todo foram 16 ensaios, sendo 4 repetições do ponto central.

As suspensões de conídios (1 mL) nos valores estabelecidos na **Tabela 5** foram utilizadas para inocular os meios dos 16 ensaios da matriz P&B. Os meios foram incubados a 25 °C a 150 rpm, por um período de 144 horas.

Tabela 5: Faixa dos valores estudados no planejamento experimental Plackett & Burman para estudo da produção de lipase por *T. harzianum* CBMAI 1229.

Variáveis	-1	0	1
X1. Óleo de soja (% v/v)	0	1,0	2,0
X2. Óleo de girassol (% v/v)	0	1,0	2,0
X3. Óleo de oliva (% v/v)	0	1,0	2,0
X4. Inóculo (susp. conídios mL ⁻¹)	1,36 x 10 ⁶	1,36 x 10 ⁷	1,36 x 10 ⁸
X5. Extrato de levedura (% m/v)	0	0,1	0,2
X6. Peptona (% m/v)	0	0,1	0,2
X7. pH	4,0	6,0	8,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.10.3 Planejamento experimental: Fatorial Fracionado 2⁵⁻¹

Com base nos resultados do segundo P&B foi estruturado um novo planejamento experimental, utilizando a matriz fatorial fracionado 2⁵⁻¹ de 16 ensaios e as variáveis independentes: diferentes concentrações de óleo de soja, óleo de girassol, extrato de levedura, peptona e pH. Os valores reais utilizados nos ensaios deste planejamento estão apresentados na **Tabela 6**. Ao todo foram 20 ensaios, sendo 4 repetições do ponto central.

Uma suspensão de células de 1,6 x 10⁶ conídios mL⁻¹ do fungo *T. harzianum* CBMAI 1229 foi utilizada para inocular 1 mL dos meios estabelecidos para os 20 ensaios. Os meios foram incubados a 25 °C, com agitação orbital de 150 rpm por um período de 144 horas.

Tabela 6: Faixa dos valores estudados no planejamento experimental fracionado 2⁵⁻¹ para estudo da produção de lipase por *T. harzianum* CBMAI 1229.

Variáveis	-1	0	1
X1. Óleo de soja (% v/v)	0	1,0	2,0
X2. Óleo de girassol (% v/v)	0	1,0	2,0
X3. Peptona (% m/v)	0	0,2	0,4
X4. Extrato de levedura (% m/v)	0	0,1	0,2
X5. pH	7,0	8,0	9,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.10.4 Planejamento experimental: Planejamento Fatorial Completo 2³

Com base nos resultados do planejamento fatorial fracionado um primeiro planejamento fatorial completo foi realizado. Neste planejamento experimental foram estabelecidas 3 variáveis independentes: óleo de girassol, extrato de levedura e peptona. Os valores reais utilizados nos ensaios deste planejamento estão apresentados na **Tabela 7**. Ao

todo foram 18 ensaios, sendo 6 pontos axiais e 4 repetições do ponto central. O pH foi ajustado a 7,0.

Uma suspensão de células de $1,5 \times 10^6$ conídios mL^{-1} do fungo *T. harzianum* CBMAI 1229 foi utilizada para inocular 1 mL dos meios estabelecidos para os 18 ensaios. Os meios foram incubados a 25 °C, com agitação orbital de 150 rpm por um período de 144 horas.

Tabela 7: Faixa dos valores estudados no planejamento experimental completo de 3 variáveis independentes para estudo da produção de lipase por *T. harzianum* CBMAI 1229.

Variáveis	-1,68	-1	0	1	1,68
X1. Óleo de girassol (% v/v)	2,0	2,4	3,0	3,6	4,0
X2. Peptona (% m/v)	0,4	0,56	0,8	1,04	1,2
X3. Extrato de levedura (% m/v)	0,2	0,24	0,3	0,36	0,4

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.10.5 Planejamento experimental: Planejamento Fatorial Completo 2^2

Após a condução do primeiro planejamento fatorial completo foi realizado um segundo Fatorial Completo com 2 variáveis independentes: extrato de levedura e peptona. Os valores reais utilizados nos ensaios deste planejamento estão apresentados na **Tabela 8**. Ao todo foram 13 ensaios, sendo 4 pontos axiais e 5 repetições do ponto central. O pH foi ajustado a 7,0.

Uma suspensão de células de $1,6 \times 10^6$ conídios mL^{-1} do fungo *T. harzianum* CBMAI 1229 foi utilizada para inocular 1 mL dos meios estabelecidos para os 18 ensaios. Os meios foram incubados a 25 °C, com agitação orbital de 150 rpm por um período de 144 horas.

Tabela 8: Faixa dos valores estudados no planejamento experimental completo com 2 variáveis independentes para estudo da produção de lipase por *T. harzianum* CBMAI 1229.

Variáveis	-1,41	-1	0	1	1,41
X1. Extrato de levedura (% m/v)	0,2	0,23	0,3	0,37	0,4
X2. Peptona (% m/v)	1,2	1,32	1,6	1,88	2,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.10.6 Validação do modelo empírico para a produção de lipase por *T. harzianum* CBMAI 1229

A validação do modelo preditivo de produção de lipase por *T. harzianum* CBMAI 1229 foi realizada simultaneamente a uma nova curva de crescimento. Os ensaios foram preparados em triplicata em condição não salina (água destilada) nas condições otimizadas,

contendo meio mineral de Olson; Johnson (1948) (g L^{-1}): KH_2PO_4 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,281; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,132; NaCl 0,1; H_3BO_3 0,0005; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,00004; KI 0,0001; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,00023; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0004; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,0004, suplementado com 3,0% (v/v) de óleo de girassol, 2,0% (m/v) de peptona e 0,2% (m/v) de extrato de levedura. O pH foi ajustado a 7,0. Os meios de cultura foram realizados em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL dos meios.

Uma suspensão de células de $1,7 \times 10^6$ conídios mL^{-1} do fungo *T. harzianum* CBMAI 1229 foi utilizada para inocular 1 mL ao meio cultura citado a cima. O meio foi incubado a 25 °C, com agitação orbital de 150 rpm por um período de 192 horas.

A cada 24 horas foram retirados 3 ensaios para separar a biomassa do extrato bruto por centrifugação a 15.400 x g e filtração em papel filtro qualitativo de 3 μm . A biomassa foi determinada de acordo com o **item 4.13.1** e o extrato bruto foi utilizado para a determinação da atividade enzimática de acordo com o **item 4.13.2**.

4.11 Purificação da principal lipase de *T. harzianum* CBMAI 1229

O filtrado de cultura, obtido em condições otimizadas para produção de lipase, foi dialisado contra tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9 por 6 h, sendo realizadas trocas de tampão a cada 2 horas. Após a diálise, a amostra foi aplicada na coluna ($r=0,8$ cm; $h=10,0$ cm) pré-empacotada com *octil agarose* (Hiprep™ 16/10 Octyl Sepharose fast flow, GE Healthcare), previamente equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9; sendo coletadas frações de 3,0 mL usando vazão de 2,0 mL min^{-1} . Após a lavagem da coluna com esse mesmo tampão, as proteínas adsorvidas foram eluídas com 100,0 mL de um gradiente linear crescente de 0–1,0% (v/v) de Triton X-100 no mesmo tampão. Após determinação da atividade enzimática de lipase, as frações com elevada atividade foram reunidas. Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4 °C e ao final de cada uma delas, procedeu-se a determinação de proteínas e da atividade enzimática da amostra resultante de acordo com o **item 4.13.2**. Alíquotas da lipase purificada foram reservadas para caracterização bioquímica e eletroforética.

4.11.1 Remoção do Triton X-100

Para caracterização eletroforética da amostra purificada, foi necessário remover o detergente Triton X-100, devido à sua interferência nesse procedimento. A remoção foi

realizada com a resina *HiPPR Detergent Removal Spin Columns* (Thermo Scientific[®], Rockford, E.U.A), seguindo as orientações do fabricante.

4.11.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio - SDS-PAGE

Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE) foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970), para verificar o estado de pureza da enzima, bem como para determinação da massa molecular da mesma, utilizando-se géis de concentração crescente de poliacrilamida (8,0 – 18,0%). As amostras foram preparadas na proporção de 1:1 em tampão de amostra (glicerol 17,5%, SDS 4,0%, azul de bromofenol 0,1% e Tris 0,12 M, pH 6,8) na presença de 10,0% de β -mercaptoetanol e aquecidas por 5 minutos em água fervente e resfriada a temperatura ambiente. A eletroforese foi realizada em tampão Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, pH 8,3 com SDS 0,1% (m/v), durante aproximadamente 3 h, sob corrente de 210 V. Após a corrida, procedeu-se a coloração de proteínas com *coomassie brilliant blue* R-250 0,1% (m/v) em metanol/ácido acético/água (4/1/5 v/v/v) por um período de 1 hora. Posteriormente, o gel foi descorado com solução de etanol/ácido acético/água (3/1/6 v/v/v) até a visualização das bandas de proteínas.

4.12 Propriedades bioquímicas da principal lipase de *T. harzianum* CBMAI 1229

4.12.1 Efeito do pH sobre a atividade enzimática

Para determinação do pH ótimo de atividade da enzima, os ensaios foram realizados em tampão glicina-HCl 0,05 M para a faixa de pH 2,0 – 3,0, tampão McIlvaine para os pH de 3,0 – 8,0, tampão Tris-HCl 0,05 M para pH 8,0 – 9,0, glicina-NaOH 0,05 M para a faixa de pH 9,0 – 10,0. A atividade foi determinada a 37 °C, conforme descrito posteriormente. A enzima foi convenientemente diluída em água ultrapura quando necessário.

4.13 Métodos analíticos

4.13.1 Avaliação do crescimento fúngico

O crescimento fúngico foi avaliado determinando-se a biomassa seca. Sendo o micélio retido no papel filtro seco em estufa a 90 °C até peso constante.

4.13.2 Determinação da atividade lipolítica

O método de determinação da atividade lipase foi proposto por (YANG et al., 2002). A solução substrato foi preparada utilizando 3,8 mg de ρ -nitrofenil palmitato (ρ NPP) solubilizado em 0,5 mL de dimetil sulfóxido (DSMO) e, em seguida, diluído a 20 mL com 0,5 mM com tampão fosfato de sódio 50,0 mM pH 7,0; contendo 0,5% de Triton X-100. A reação foi iniciada pela adição de 100 μ L do filtrado de cultura, ou da enzima purificada, diluído convenientemente, a 900 μ L da solução de substrato, mantido a 37 °C durante dois intervalos de tempo diferentes (1 e 2 minutos). Em seguida, a reação foi parada com choque térmico (96 °C) durante um minuto, acompanhado da adição de 1 mL de tetraborato de sódio saturado. O branco da reação correspondeu ao mesmo meio reacional descrito acima, adicionado de 100 μ L da mesma amostra do filtrado de cultura e mantido a 96 °C durante 1 minuto, seguido da adição de 1 mL de tetraborato de sódio. O ρ -nitrofenol liberado foi determinado pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de ρ -nitrofenol por mililitro por minuto de reação. Nas condições do ensaio, o valor da absorvidade molar do ρ -nitrofenol (ϵ) foi de $1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram apresentados em U mL^{-1} .

4.13.3 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método BCA, inicialmente proposto por Smith et al. (1985), utilizando PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) usando soro de albumina bovina (BSA) como padrão. Durante a etapa de purificação, a determinação de proteínas foi realizada pela medida da absorbância a 280 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação taxonômica dos fungos de origem marinha

A região ITS da linhagem *Fusarium* sp. CBMAI 1227, inicialmente identificado morfológicamente por Garcia (2010), foi contrastado com o banco de dados do GenBank, que confirmou o gênero, no entanto, não foi possível identificar até espécie. É sabido que a região ITS não apresenta uma resolução para separar algumas espécies do gênero *Fusarium* sp., visto que as buscas nas bases de dados retornaram mais de uma espécie de *Fusarium* apresentado sequências ITS idênticas (GRÄFENHAN et al., 2011).

A sequência de nucleotídeos que codifica o fator de alongação 1- α (*tef*) foi utilizado para buscas no banco de dados *online* da *International Subcommission on Trichoderma and Hypocrea* (ISTH, <http://www.isth.info/>), um banco de dados *barcode*, curado, em que é possível identificar as espécies de *Trichoderma*. Com base nas comparações de sequências, a linhagem *Trichoderma* sp. CBMAI 1229 foi identificada como *Trichoderma harzianum*, enquanto a linhagem *Trichoderma* sp. CBMAI 1230 foi identificada como *Trichoderma longibrachiatum*.

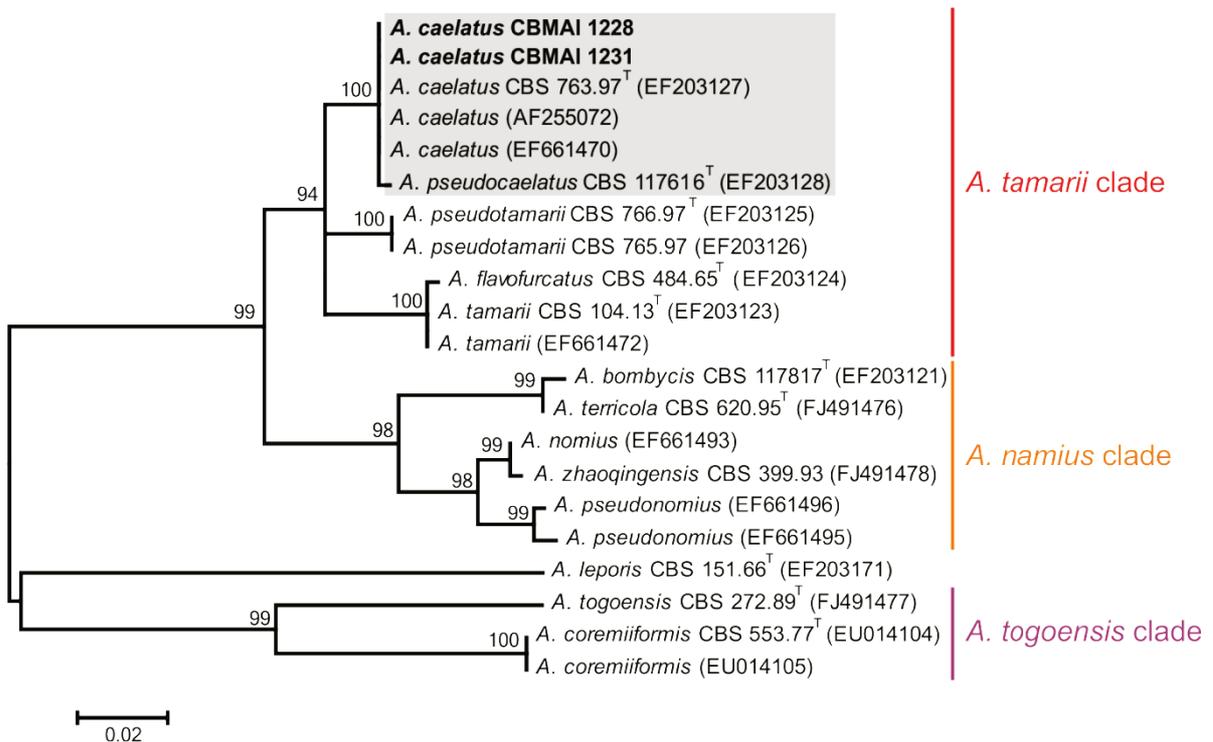
Os resultados do alinhamento e comparação de sequências da β -tubulina das linhagens *Aspergillus parasitticus* CBMAI 1228 e *Aspergillus parasitticus* CBMAI 1231 (500 bp) com as sequências β -tubulina de 19 representantes do gênero *Aspergillus* selecionados de Varga; Frisvad; Samson (2011), revelaram uma espécie diferente da identificada inicialmente no trabalho de Garcia (2010). As duas sequências se mostraram idênticas e intimamente relacionadas com a sequência de *Aspergillus caelatus* pertencente ao clado *Aspergillus tamarii* e próxima ao clado *Aspergillus namius* (**Figura 12**).

O alinhamento e comparação da sequência de β -tubulina da linhagem inicialmente identificada como *Aspergillus niger* CBMAI 1232 (507 pb) demonstrou similaridade com duas espécies diferentes, mas evolutivamente próximas entre si. A análise filogenética realizada a partir de 17 representantes do gênero *Aspergillus* obtidos de Jurjević et al. (2012) (**Figura 13**), permitiu identificar a linhagem CBMAI 1232 como *Aspergillus* cf. *tubingensis*, uma vez que não foi possível distinguir a espécie, utilizando um único locus. Essa espécie pertence a clade *Aspergillus niger* e está próxima à clade *Aspergillus carbonarius*.

O fato de encontrar espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Trichoderma* associados aos invertebrados marinhos, suporta o caráter cosmopolita desses gêneros. Por

exemplo, os três gêneros são comumente encontrados no solo, no ar e na superfície de plantas (SEIFERT et al., 2011).

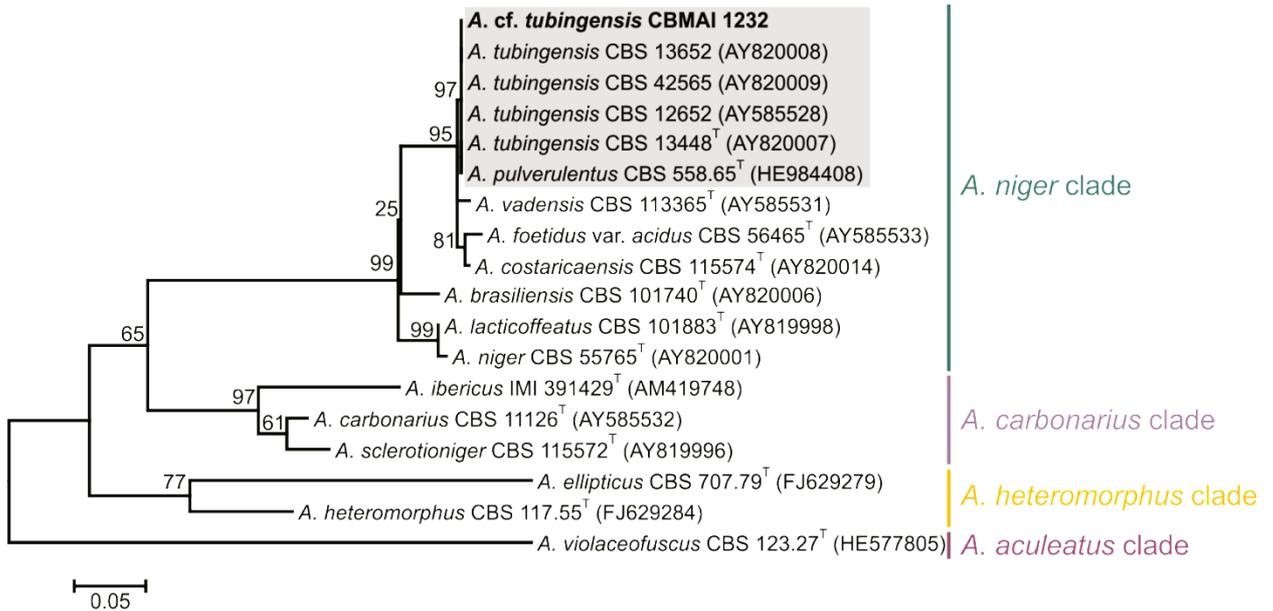
Figura 12: Árvore filogenética inferida a partir das sequências geradas neste estudo e obtidas do banco de dados do GenBank (códigos em parênteses). As espécies *Aspergillus leporis* CBS 151.66, *Aspergillus togoensis* CBS 272.89, *Aspergillus coremiiformis* CBS 553.77 e *Aspergillus coremiiformis* foram usadas como *outgroups*. Em negrito, os isolados estudados. Destaque em cinza, a clade a qual pertence à espécie. Números sobre os ramos indicam valores de *bootstrap*. A história evolutiva foi inferida usando Kimura 2-parâmetros e distribuição gamma, pelo método de máxima verossimilhança.



^T Espécie tipo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13: Árvore filogenética inferida a partir das seqüências geradas neste estudo e obtidas do banco de dados do GenBank (códigos em parênteses). A espécie *Aspergillus violaceofuscus* CBS 123.27 foi usada como *outgroup*. Em negrito, a espécie estudada. Destaque em cinza, a clade a qual pertence à espécie. Números sobre as ramificações indicam valores de *bootstrap*. A história evolutiva foi inferida usando Kimura 2-parâmetros mais distribuição gamma, pelo método de máxima verossimilhança.



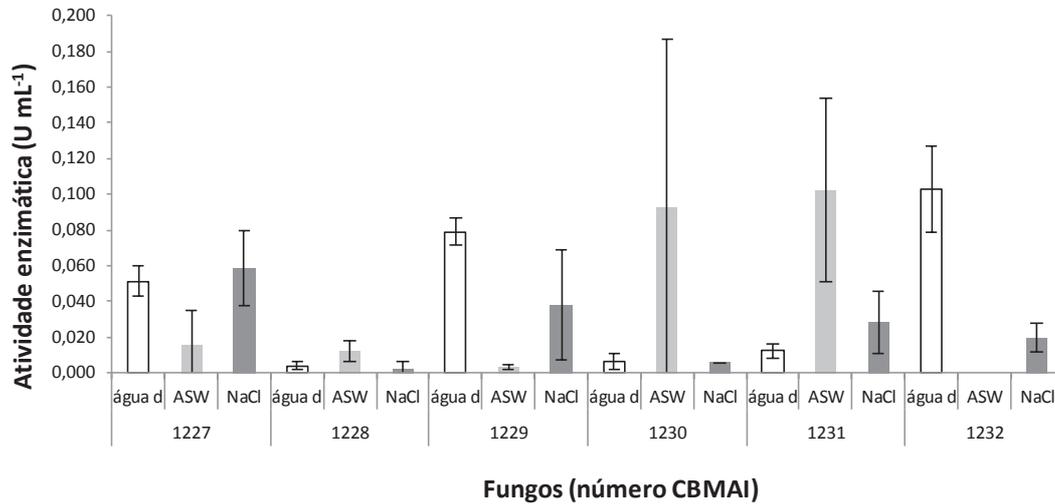
^T Espécie tipo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Seleção do melhor fungo produtor de lipase em meio básico

Os resultados referentes à seleção do melhor fungo produtor de lipase em meio básico estão apresentados na **Figura 14**. Os 6 fungos filamentosos marinhos utilizados na triagem apresentaram produção de lipase sob as condições estabelecidas no **item 4.7**. No meio sem salinidade (água d), todos os isolados apresentaram produção de enzima com destaque para o fungo *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229 $0,079 \pm 0,0074$ U mL⁻¹ e *Aspergillus* cf. *tubingensis* CBMAI 1232 $0,103 \pm 0,0241$ U mL⁻¹. No meio com água do mar artificial (ASW), o fungo *Aspergillus* cf. *tubingensis* CBMAI 1232 foi o único que não foi possível identificar produção de lipase. Já os fungos *Trichoderma longibrachiatum* CBMAI 1230 e *Aspergillus caelatus* CBMAI 1231 apresentaram maiores produção de lipase, entretanto, tiveram alto desvio padrão, $0,093 \pm 0,094$ U mL⁻¹ e $0,103 \pm 0,0512$ U mL⁻¹, respectivamente. O meio contendo cloreto de sódio (NaCl) foi favorável a produção de lipase para todos os fungos estudados, com destaque para *Fusarium* sp. CBMAI 1227 que apresentou produção de $0,059 \pm 0,0210$ U mL⁻¹.

Figura 14: Seleção dos fungos filamentosos com melhores resultados de quantificação enzimática nas condições estudadas. Água destilada (água d), água do mar artificial (ASW) e cloreto de sódio (NaCl). *Fusarium* sp. CBMAI 1227, *Aspergillus caelatus* CBMAI 1228, *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229, *Trichoderma longibrachiatum* CBMAI 1230, *Aspergillus caelatus* 1231 e *Aspergillus cf. tubingensis* CBMAI 1232.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A produção de lipase por representantes do gênero *Fusarium* é bem relatada na literatura. Rifaat et al. (2010) estudou vários parâmetros sobre a produção de lipase por *Fusarium oxysprum* e obteve 16,0 U mL⁻¹, com 2,0 % (v/v) de óleo de oliva em meio de cultura sem salinidade. Uma busca no “Google Patentes” (<https://www.google.com/?tbn=pts>) reportou diversos pedidos de patentes para lipase produzidas por esse gênero.

Há poucos relatos na literatura sobre a produção de lipase por fungos do gênero *Trichoderma*. O interesse na aplicação biotecnológica desse gênero está na produção de celulase e, principalmente, no uso em biocontrole de pragas agrícolas (GAL-HEMED et al., 2011; HARMAN et al., 2012; SANTOS VAZ, 2010; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010), sendo as espécies *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens* e *Trichoderma viridescens* as mais utilizadas como agentes no controle biológico (BCAs) de fitopatogenos (HERMOSA et al., 2000). O primeiro relato sobre produção de lipase por *Trichoderma harzianum* foi realizado por Ülker et al. (2011), a linhagem foi isolada do solo e máxima produção de lipase (0,24 U mL⁻¹) foi obtida com glicose e peptona como melhores fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

Inúmeros estudos relatam a importância do gênero *Aspergillus* para uso biotecnológico. Lipases produzidas por esse gênero são amplamente usadas na indústria devido a propriedades bioquímicas como estabilidade a temperatura e pH, e

enantioseletividade. No entanto, não há relatos na literatura sobre a produção de lipase por *Aspergillus caelatus* e *Aspergillus tubingensis*. Apenas a espécie *Aspergillus tubingensis* reportou produção de lipase no buscador de patentes “Google Patentes”. Pera et al. (2006) selecionaram a linhagem *Aspergillus niger* MYA 135, como produtora de lipase, utilizando o método Rhodamina-B. Em processo de cultivo submerso, suplementado com 2,0% de óleo de oliva, a lipase apresentou características importantes em aplicações industriais como estabilidade a pH e a temperatura.

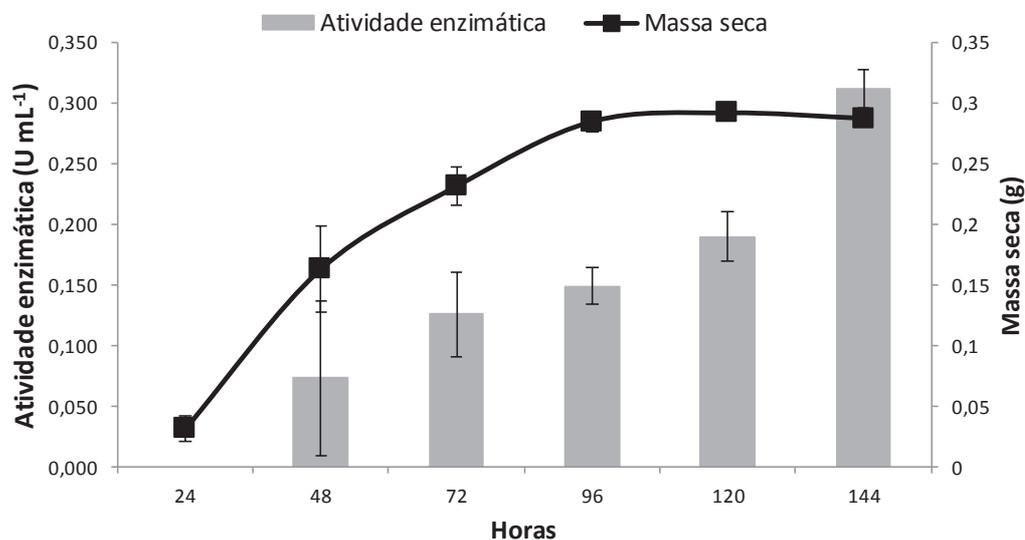
Com base nos resultados de produção de lipases e considerando o desvio padrão observado, os fungos *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229 e *Aspergillus* cf. *tubingensis* CBMAI 1232 foram selecionadas para as etapas subsequentes do presente estudo.

5.3 Determinação do tempo inicial de cultivo

Para determinar o tempo inicial de cultivo, foi realizada uma curva de crescimento acompanhada da atividade enzimática para os fungos *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229 e *Aspergillus* cf. *tubingensis* CBMAI 1232, selecionados na triagem inicial.

Nas 24 horas iniciais do cultivo do fungo *T. harzianum* CBMAI 1229 não foi possível identificar atividade enzimática, apesar disso, houve um pequeno crescimento celular. Nas horas seguintes a atividade enzimática aumentou continuamente, tendo um pico em 144 horas após o início do cultivo ($0,311 \pm 0,02 \text{ U mL}^{-1}$) (Figura 15).

Figura 15: Curva de crescimento acompanhado da atividade enzimática de *T. harzianum* CBMAI 1229 durante 144 horas. Cultivado em com meio mineral de (VOGEL, 1956), 2,0% de óleo de oliva e 0,2% de extrato de levedura, 25 °C, a 150 rpm.

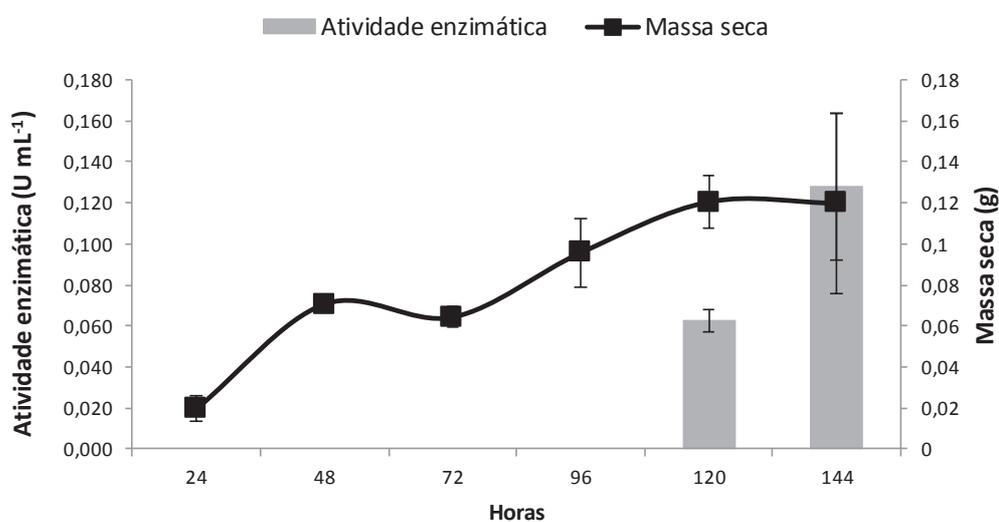


Fonte: Elaborado pelo autor.

A fase de crescimento exponencial do fungo *T. harzianum* CBMAI 1229 foi até 96 horas após o início do cultivo. A partir deste ponto, o crescimento estagnou e teve início a fase estacionária. Entre 120 e 144 horas houve um salto de produção de lipase em $0,122 \text{ U mL}^{-1}$, justamente quando o fungo estava na fase estacionária de crescimento, possivelmente, a fonte de carbono se esgotou e, com isso, não permitiu um crescimento maior.

A produção de lipase pelo fungo *Aspergillus cf. tubigenis* CBMAI 1232 foi identificada após 120 horas do início do cultivo ($0,063 \pm 0,0058 \text{ U mL}^{-1}$), sendo o pico em 144 horas ($0,128 \pm 0,0356 \text{ U mL}^{-1}$). Houve crescimento do micro-organismo até 48 horas, quando foi observado um declive em 72 horas e posterior aumento do crescimento celular. Em 120 horas nota-se o início da fase estacionária, justamente quando foi identificado o início da produção de lipase (**Figura 16**).

Figura 16: Curva de crescimento acompanhado da atividade enzimática de *Aspergillus cf. tubigenis* CBMAI 1232 durante 144 horas. Cultivado em com meio mineral de (VOGEL, 1956), 2,0% de óleo de oliva e 0,2% de extrato de levedura, 25 °C, a 150 rpm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos os micro-organismos necessitam de um meio básico nutricional para a germinação dos esporos. Fatores como concentrações de íons, dióxido de carbono, oxigênio, presença de luz, fontes de nitrogênio e carbono afetam diretamente a dilatação dos esporos influenciando a sua germinação. Além disso, algumas espécies de fungos apresentam uma reserva energética denominada glucana, um polissacarídeo formado por monômeros de D-

glicose. Isso explicaria o crescimento da linhagem *Aspergillus cf. tubingensis*, observado na **Figura 16** (GRIFFIN, 1994; MOAT; FOSTER, 1988).

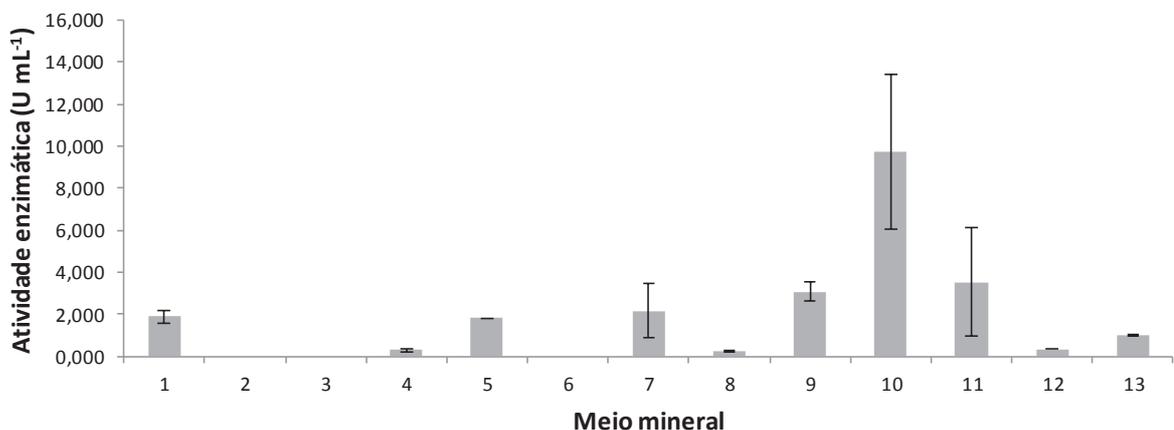
Sob condições ideais, em que a divisão celular começa imediatamente e procede sem entraves ao longo do tempo, a divisão celular segue uma progressão geométrica, fase exponencial, observado no crescimento da linhagem *T. harzianum* CBMAI 1229 (**Figura 15**) de 24 a 96 horas, e no crescimento da linhagem *Aspergillus cf. tubingensis* CBMAI 1232 (**Figura 16**) de 24 a 48 horas e 72 a 120 horas. A fase estacionária iniciou em 96 e 120 horas para os fungos *T. harzianum* e *Aspergillus cf. tubingensis*, respectivamente. Pode ser devido ao consumo da fonte de carbono e nitrogênio, mudanças no pH e acúmulo de produtos tóxicos ao micro-organismo (GRIFFIN, 1994; MOAT; FOSTER, 1988).

Cihngir e Sarikaya (2004) testaram o período inicial de produção de lipase por *Aspergillus* sp. Os autores observaram que a máxima atividade ($16,66 \text{ U mL}^{-1}$) foi obtida com 96 horas e que, após esse tempo, a atividade decaía. Assim, na sequência do processo de otimização, o tempo de cultivo foi interrompido em 96 horas, após alcançar a fase estacionária de crescimento.

5.4 Determinação do melhor meio mineral para a produção de lipase

Dentre os 13 meios minerais estudados para produção de lipase pelo fungo *T. harzianum* CBMAI 1229 não foi possível identificar atividade enzimática nos ensaios 2, 3 e 6, contudo, o crescimento celular foi observado em todos os ensaios (**Figura 17** e **Figura 18**).

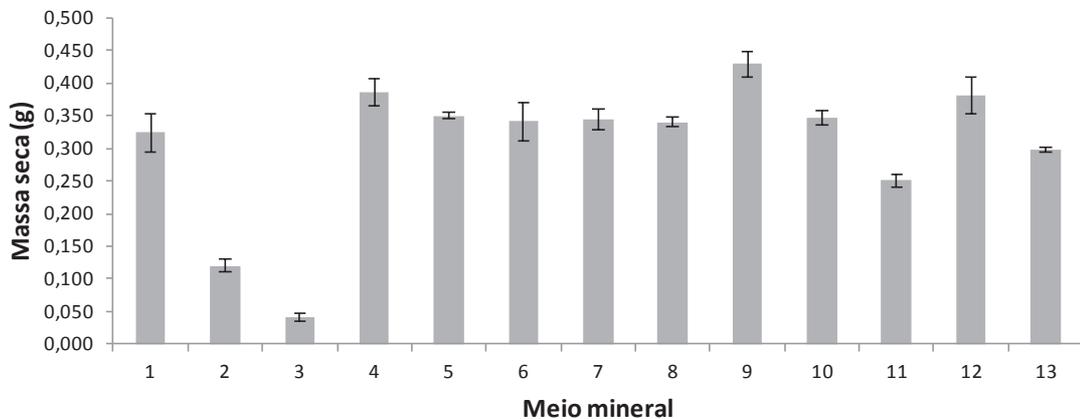
Figura 17: Atividade enzimática de lipase de *T. harzianum* CBMAI 1229 em diferentes meios minerais: (1, modificado) (KASHMIRI; ADNAN; BUTT, 2006), (2) (ÜLKER et al., 2011), (3) (RIFAAT et al., 2010), (4) (PERA et al., 2006), (5, 6 7 e 8) (ADHAM; AHMED, 2009), (9) (COLIN; BAIGORÍ; PERA, 2011), (10) (OLSON; JOHNSON, 1948), (11 e 12, modificado) (GOCHEV et al., 2012) e (13) (VOGEL, 1956). Suplementado com 2,0 % de óleo de oliva e 0,2 % de extrato de levedura, cultivado a 25 °C e a 150 rpm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A maior produção de lipase pelo fungo *T. harzianum* CBMAI 1229 ($9,72 \pm 3,65$ U mL⁻¹) foi observada com o meio mineral Olson e Johnson (1948) (ensaio 10) que foi 9,5 vezes superior ao cultivo contendo meio mineral de Vogel (1956) (ensaio 13), utilizado inicialmente na etapa de seleção do melhor fungo produtor. Assim, o meio mineral Olson e Johnson (1948) foi o escolhido para a continuidade do processo de otimização.

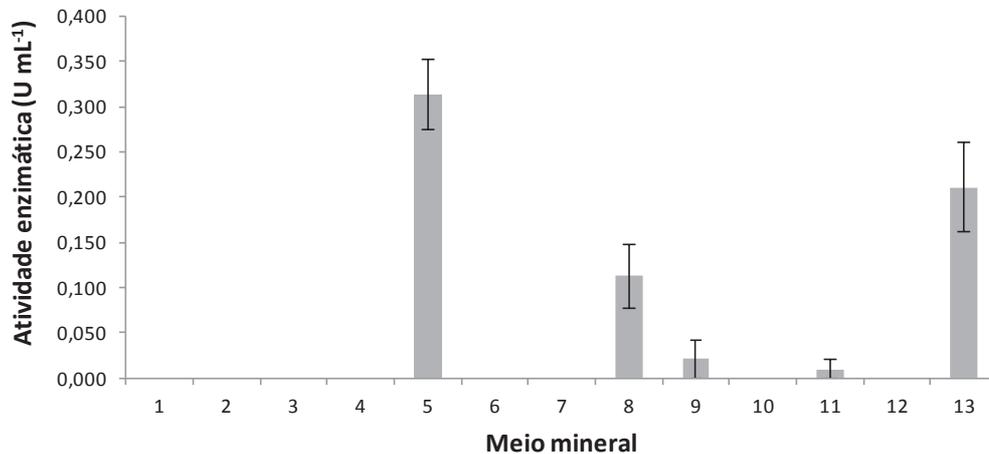
Figura 18: Massa seca de *T. harzianum* CBMAI 1229 em diferentes meios minerais: (1, modificado) (KASHMIRI; ADNAN; BUTT, 2006), (2) (ÜLKER et al., 2011), (3) (RIFAAT et al., 2010), (4) (PERA et al., 2006), (5, 6, 7 e 8) (ADHAM; AHMED, 2009), (9) (COLIN; BAIGORÍ; PERA, 2011), (10) (OLSON; JOHNSON, 1948), (11 e 12, modificado) (GOACHEV et al., 2012) e (13) (VOGEL, 1956). Suplementado com 2,0 % de óleo de oliva e 0,2 % de extrato de levedura, cultivado a 25 °C e a 150 rpm.



Fonte: Elaborado pelo autor

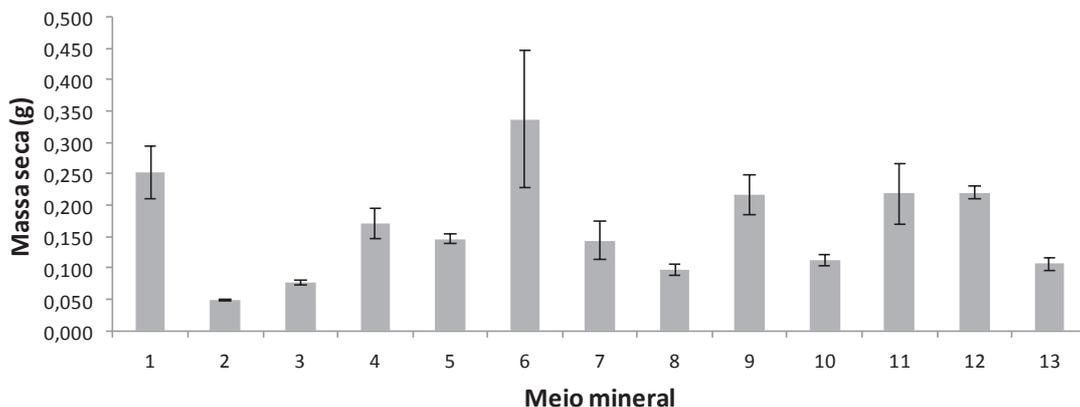
Para o fungo *Aspergillus cf. tubigenis* CBMAI 1232 não foi possível identificar atividade enzimática nos ensaios 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10 e 12 (**Figura 19**), porém, o crescimento celular foi observado em todos os ensaios (**Figura 20**). A maior produção de lipase por esse fungo ($0,313 \pm 0,0389$ U mL⁻¹) foi observada com meio mineral Adham e Ahmed, (2009) (ensaio 5), 1,5 vezes superior ao cultivo contendo meio mineral de Vogel (1956) (ensaio 13).

Figura 19: Atividade enzimática de lipase de *Aspergillus cf. tubingensis* CBMAI 1232 em diferentes meios minerais: (1, modificado) (KASHMIRI; ADNAN; BUTT, 2006), (2) (ÜLKER et al., 2011), (3) (RIFAAT et al., 2010), (4) (PERA et al., 2006), (5, 6 7 e 8) (ADHAM; AHMED, 2009), (9) (COLIN; BAIGORÍ; PERA, 2011), (10) (OLSON; JOHNSON, 1948), (11 e 12, modificado) (GOACHEV et al., 2012) e (13) (VOGEL, 1956). Suplementado com 2,0 % de óleo de oliva e 0,2 % de extrato de levedura, cultivado a 25 °C e a 150 rpm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20: Massa seca de *Aspergillus cf. tubingensis* CBMAI 1232 em diferentes meios minerais: (1, modificado) (KASHMIRI; ADNAN; BUTT, 2006), (2) (ÜLKER et al., 2011), (3) (RIFAAT et al., 2010), (4) (PERA et al., 2006), (5, 6 7 e 8) (ADHAM; AHMED, 2009), (9) (COLIN; BAIGORÍ; PERA, 2011), (10) (OLSON; JOHNSON, 1948), (11 e 12, modificado) (GOACHEV et al., 2012) e (13) (VOGEL, 1956). Suplementado com 2,0 % de óleo de oliva e 0,2 % de extrato de levedura, cultivado a 25 °C e a 150 rpm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Devido a menor atividade enzimática apresentada pelo fungo *Aspergillus cf. tubingensis* CBMAI 1232 comparada à atividade apresentada por *T. harziannum* CBMAI 1229, esse último foi selecionado para as etapas seguintes visando otimização da produção enzimática.

Cabe destacar, que não há relatos na literatura consultada sobre a produção de lipase por representantes marinhos do gênero *Trichoderma*. Porém, alguns representantes do gênero *Trichoderma* isolados de amostras terrestres foram reportados como produtores de lipases (KASHMIRI; ADNAN; BUTT, 2006; ÜLKER et al., 2011).

A composição do meio mineral influencia fortemente a produção de enzimas. Adham e Ahmed (2009) selecionaram quatro linhagens de *Aspergillus niger* para a produção de lipase. Cada uma foi cultivada em meios diferentes incluindo pH, meio mineral, fonte de carbono e nitrogênio. O melhor meio para a produção de lipase foi pH 6,0; 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05% KCl; 0,2% K_2HPO_4 ; 3,0% de peptona; 1,0% de óleo de oliva:glicose (0,5:0,5). A máxima atividade enzimática foi *A. niger* A20 190 U mL^{-1} ; *A. niger* NRRL 599 320 U mL^{-1} ; *A. niger* NRRL3 325 U mL^{-1} e *A. niger* A10 250 U mL^{-1} comparado aos outros três meios. Tan et al. (2004) observaram a influencia negativa de íons Ca^{2+} e Fe^{2+} sobre a produção de lipase. Os autores ressaltaram, que esses íons podem formar complexos ionizados com ácidos graxos provenientes do óleo de soja, mudando a sua carga e, conseqüentemente, sua solubilidade, afetando a interface lipídeo-água. Davranov e Khalameizer (1997) ressaltaram o comportamento ambíguo do íon Ca^{2+} sobre algumas lipases durante o processo catalítico, afetando tanto o centro catalítico, mudando sua conformação, quanto o estado físico do substrato, resultando em aumento da atividade lipolítica. Outro íon que influencia positivamente a atividade enzimática seria o Mg^{2+} . Além disso, os autores relatam a forte inibição de íons como Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} e Ni^{2+} sobre lipases produzidas por *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp.. Já Colin, Baigori e Pera (2010) observaram que a adição de 0,5 g L^{-1} de CaCl_2 e 1,0 g L^{-1} de FeCl_3 ao meio basal elevou a produção de lipase em 2,6 e 6,6 vezes, respectivamente, comparado ao controle. Os autores relacionaram o aumento da atividade a mecanismos de regulação da secreção controlado por íons Ca^{2+} e a regulação extracelular exercida pelo íon Fe^{3+} .

5.5 Otimização de produção de lipase por *T. harzianum* CBMAI 1229 utilizando planejamento experimental

Dentre os 19 ensaios do primeiro P&B apenas dois apresentaram atividade enzimática de lipase (ensaio 2 e 6), ambos em condição de ausência de nitrato de amônio NH_4NO_3 e sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em suas composições (**Tabela 9**). Assim, para a condução do segundo P&B, esses dois elementos foram retirados da matriz do planejamento. Em adição, a

rotação foi fixada em 150 rpm, devido a logística do laboratório e adequação do processo de otimização (**item 5.4**).

Tabela 9: Matriz do planejamento experimental do tipo P&B (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática).

Ensaio ^a	Inóculo (conídios mL ⁻¹) ^b	Óleo de oliva (mL) ^b	Óleo de girassol (mL) ^b	Óleo de soja (mL) ^b	Extrato de levedura (g) ^b	Peptona (g) ^b	Sulfato de amônio (g) ^b	Nitrato de amônio (g) ^b	Agitação (rpm) ^b	pH ^b	Atividade enzimática (U mL ⁻¹) ^c
1	1,0 a 2,0 10 ⁸ (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	180 (+1)	4,0 (-1)	ND
2	1,0 a 2,0 10 ⁸ (+1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	180 (+1)	8,0 (+1)	0,75
3	1,0 a 2,0 10 ⁸ (+1)	0,5 (+1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	0,0 (-1)	120 (-1)	8,0 (+1)	ND
4	1,0 a 2,0 10 ⁸ (+1)	0,5 (+1)	0,5 (+1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	120 (-1)	4,0 (-1)	ND
5	1,0 a 2,0 10 ⁶ (-1)	0,5 (+1)	0,5 (+1)	0,5 (+1)	0,05 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	180 (+1)	4,0 (-1)	ND
6	1,0 a 2,0 10 ⁸ (+1)	0,0 (-1)	0,5 (+1)	0,5 (+1)	0,05 (+1)	0,05 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	120 (-1)	8,0 (+1)	3,17
7	1,0 a 2,0 10 ⁶ (-1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,5 (+1)	0,05 (+1)	0,05 (+1)	0,05 (+1)	0,0 (-1)	120 (-1)	4,0 (-1)	ND
8	1,0 a 2,0 10 ⁸ (+1)	0,0 (-1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	0,05 (+1)	0,05 (+1)	0,05 (+1)	120 (-1)	4,0 (-1)	ND
9	1,0 a 2,0 10 ⁸ (+1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	0,05 (+1)	0,05 (+1)	180 (+1)	4,0 (-1)	ND
10	1,0 a 2,0 10 ⁶ (-1)	0,5 (+1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	0,05 (+1)	180 (+1)	8,0 (+1)	ND
11	1,0 a 2,0 10 ⁶ (-1)	0,0 (-1)	0,5 (+1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	180 (+1)	8,0 (+1)	ND
12	1,0 a 2,0 10 ⁸ (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,5 (+1)	0,05 (+1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	0,0 (-1)	180 (+1)	8,0 (+1)	ND
13	1,0 a 2,0 10 ⁶ (-1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	0,05 (+1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	120 (-1)	8,0 (+1)	ND
14	1,0 a 2,0 10 ⁶ (-1)	0,0 (-1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	0,05 (+1)	0,0 (-1)	180 (+1)	4,0 (-1)	ND
15	1,0 a 2,0 10 ⁶ (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	0,05 (+1)	120 (-1)	8,0 (+1)	ND
16	1,0 a 2,0 10 ⁶ (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	120 (-1)	4,0 (-1)	ND
17 (c)	1,0 a 2,0 10 ⁷ (0)	0,25 (0)	0,25 (0)	0,25 (0)	0,025 (0)	0,025 (0)	0,025 (0)	0,025 (0)	150 (0)	6,0 (0)	ND
18 (c)	1,0 a 2,0 10 ⁷ (0)	0,25 (0)	0,25 (0)	0,25 (0)	0,025 (0)	0,025 (0)	0,025 (0)	0,025 (0)	150 (0)	6,0 (0)	ND
19 (c)	1,0 a 2,0 10 ⁷ (0)	0,25 (0)	0,25 (0)	0,25 (0)	0,025 (0)	0,025 (0)	0,025 (0)	0,025 (0)	150 (0)	6,0 (0)	ND

^a (c) ponto central.

^b (-1), (0) e (+1) são níveis codificados.

^c ND: atividade não detectada nas condições de ensaio.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o segundo planejamento P&B foi utilizada a matriz apresentada abaixo (**Tabela 10**). Os ensaios 10 e 11 derivaram os melhores resultados de atividade enzimática (15,09 e 13,53 U mL⁻¹, respectivamente). A análise dos efeitos principais das variáveis estudadas e as interações entre elas estão apresentadas na **Tabela 11**.

Tabela 10: Matriz do planejamento experimental do tipo P&B (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática).

Ensaio ^a	Óleo de soja (mL) ^b	Óleo de girassol (mL) ^b	Óleo de oliva (mL) ^b	Inóculo (conídios mL ⁻¹) ^b	Extrato de levedura (g) ^b	Peptona (g) ^b	pH ^b	Atividade enzimática (U mL ⁻¹) ^c
1	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,5 (+1)	1,0 a 2,0 10 ⁶ (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	8,0 (+1)	ND
2	0,5 (+1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	1,0 a 2,0 10 ⁸ (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	4,0 (-1)	ND
3	0,0 (-1)	0,5 (+1)	0,5 (+1)	1,0 a 2,0 10 ⁶ (-1)	0,05 (+1)	0,0 (-1)	4,0 (-1)	ND
4	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,5 (+1)	1,0 a 2,0 10 ⁸ (-1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	4,0 (-1)	ND
5	0,5 (+1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	1,0 a 2,0 10 ⁸ (-1)	0,05 (+1)	0,0 (-1)	8,0 (+1)	1,28
6	0,5 (+1)	0,5 (+1)	0,5 (+1)	1,0 a 2,0 10 ⁶ (-1)	0,05 (+1)	0,05 (+1)	4,0 (-1)	ND
7	0,0 (-1)	0,5 (+1)	0,5 (+1)	1,0 a 2,0 10 ⁸ (-1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	8,0 (+1)	3,87
8	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,5 (+1)	1,0 a 2,0 10 ⁸ (-1)	0,05 (+1)	0,0 (-1)	8,0 (+1)	3,68
9	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	1,0 a 2,0 10 ⁸ (-1)	0,05 (+1)	0,05 (+1)	4,0 (-1)	0,17
10	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	1,0 a 2,0 10 ⁶ (-1)	0,05 (+1)	0,05 (+1)	8,0 (+1)	15,09
11	0,0 (-1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	1,0 a 2,0 10 ⁶ (-1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	8,0 (+1)	13,53
12	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	1,0 a 2,0 10 ⁶ (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	4,0 (-1)	ND
13 (c)	0,25 (0)	0,25 (0)	0,25 (0)	1,0 a 2,0 10 ⁷ (0)	0,025 (0)	0,025 (0)	6,0 (0)	4,10
14 (c)	0,25 (0)	0,25 (0)	0,25 (0)	1,0 a 2,0 10 ⁷ (0)	0,025 (0)	0,025 (0)	6,0 (0)	1,39
15 (c)	0,25 (0)	0,25 (0)	0,25 (0)	1,0 a 2,0 10 ⁷ (0)	0,025 (0)	0,025 (0)	6,0 (0)	1,48
16 (c)	0,25 (0)	0,25 (0)	0,25 (0)	1,0 a 2,0 10 ⁷ (0)	0,025 (0)	0,025 (0)	6,0 (0)	4,72

^a (c) ponto central.^b (-1), (0) e (+1) são níveis codificados.^c ND: atividade não detectada nas condições de ensaio.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 11: Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento Plackett & Burman com 7 variáveis.

Variáveis	Efeito	Erro padrão	t	p
Média	3,08277	0,767890	4,01459	0,003870
Óleo de soja	-0,81469	1,773366	-0,45940	0,658170
Óleo de girassol	-0,04370	1,773366	-0,02464	0,980942
Óleo de oliva	-3,75435	1,773366	-2,11708	0,067130
Inóculo	-3,27080	1,773366	-1,84440	0,102352
Extrato de levedura	0,46932	1,773366	0,26465	0,797970
Peptona	4,62009	1,773366	2,60527	0,031360
pH	6,21386	1,773366	3,50399	0,008032

Nível de confiança: 0,9.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os fatores óleo de oliva, peptona e pH apresentaram efeito estatisticamente significativo a 90,0% de confiança. O óleo de oliva influenciou negativamente na atividade enzimática (em média 3,75 U mL⁻¹) quando a concentração passou do nível -1 (zero) para o nível +1 (2,0% v/v), por conseguinte, a variável foi retirada da próxima matriz do

planejamento experimental, uma vez que a concentração no nível -1 foi zero. Enquanto que a peptona apresentou efeito positivo sobre a atividade enzimática (em média $4,6 \text{ U mL}^{-1}$) quando passou do nível -1 (0,0% m/v) para o nível +1 (0,2% m/v), logo esta variável teve o nível de concentração elevada para a terceira etapa do planejamento experimental. O efeito do pH sobre a atividade enzimática também influenciou positivamente (em média $6,2 \text{ U mL}^{-1}$) do nível -1 (6,0) para o nível +1 (8,0), assim, o nível do pH também foi elevado na matriz seguinte.

Para a variável inóculo o p-valor foi um pouco maior do que 0,1 ($p=0,102352$) e a mesma apresentou efeito negativo (em média $3,27 \text{ U mL}^{-1}$) quando passou do nível -1 (1,0 a $2,0 \times 10^6$) para o nível +1 (1,0 a $2,0 \times 10^8$), portanto essa variável foi fixada no nível -1 (1,0 a $2,0 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ de conídios), já que foi a menor concentração. Em adição, os níveis das concentrações de óleo de soja e óleo de girassol foram mantidas para a etapa seguinte, pois não foram significativas.

A partir da análise da etapa anterior foi realizado um planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-1} de acordo com a matriz apresentada na **Tabela 12**. No ensaio 15, uma maior atividade enzimática foi observada ($49,27 \text{ U mL}^{-1}$). A análise dos efeitos principais das variáveis estudadas estão apresentadas na **Tabela 13**.

Tabela 12: Matriz do planejamento experimental do tipo fatorial fracionado 2^{5-1} (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática).

Ensaio ^a	Óleo soja (mL) ^b	Óleo de girassol (mL) ^b	Peptona (g) ^b	Extrato de levedura (g) ^b	pH ^b	Atividade enzimática (U mL ⁻¹) ^c
1	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	9,0 (+1)	ND
2	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	7,0 (-1)	ND
3	0,0 (-1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	7,0 (-1)	ND
4	0,5 (+1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	9,0 (+1)	ND
5	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,1 (+1)	0,0 (-1)	7,0 (-1)	ND
6	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,1 (+1)	0,0 (-1)	9,0 (+1)	9,78
7	0,0 (-1)	0,5 (+1)	0,1 (+1)	0,0 (-1)	9,0 (+1)	10,03
8	0,5 (+1)	0,5 (+1)	0,1 (+1)	0,0 (-1)	7,0 (-1)	4,97
9	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	7,0 (-1)	0,12
10	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	9,0 (+1)	1,73
11	0,0 (-1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	9,0 (+1)	3,88
12	0,5 (+1)	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,05 (+1)	7,0 (-1)	1,22
13	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,1 (+1)	0,05 (+1)	9,0 (+1)	ND
14	0,5 (+1)	0,0 (-1)	0,1 (+1)	0,05 (+1)	7,0 (-1)	5,49
15	0,0 (-1)	0,5 (+1)	0,1 (+1)	0,05 (+1)	7,0 (-1)	49,27
16	0,5 (+1)	0,5 (+1)	0,1 (+1)	0,05 (+1)	9,0 (+1)	1,85
17 (c)	0,25 (0)	0,25 (0)	0,05 (0)	0,025 (0)	8,0 (0)	3,09
18 (c)	0,25 (0)	0,25 (0)	0,05 (0)	0,025 (0)	8,0 (0)	3,00
19 (c)	0,25 (0)	0,25 (0)	0,05 (0)	0,025 (0)	8,0 (0)	1,83
20 (c)	0,25 (0)	0,25 (0)	0,05 (0)	0,025 (0)	8,0 (0)	4,14

^a (c) ponto central.^b (-1), (0) e (+1) são níveis codificados.^c ND: atividade não detectada nas condições de ensaio.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 13: Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento experimental fracionado 2^{5-1} .

Variáveis	Efeito	Erro padrão	t	p
Média	5,02066	2,276354	2,205571	0,044632
Óleo de soja	-4,78325	5,090083	-0,939719	0,363293
Óleo de girassol	6,76135	5,090083	1,328338	0,205315
Peptona	9,30429	5,090083	1,827925	0,088946
Extrato de levedura	4,84818	5,090083	0,952475	0,357012
pH	-4,22573	5,090083	-0,830188	0,420365

Nível de confiança: 0,9

Fonte: Elaborado pelo autor através do software STATISTICA 8,0

Neste planejamento, apenas a peptona apresentou efeito estatisticamente significativo a 90,0% de confiança. Sendo que o efeito foi positivo (em média 9,30 U mL⁻¹) sobre a atividade enzimática, quando passou do nível -1 (0,0% m/v) para o nível +1 (0,4% m/v), assim, a variável foi mantida e o nível de sua concentração foi elevada para a etapa seguinte.

O efeito do óleo de soja, óleo de girassol, extrato de levedura e pH não foram significativos. Como no ensaio 15, onde foi obtida a maior atividade enzimática, a concentração de óleo de soja era zero (-1) e o efeito apresentado foi negativo, essa variável foi excluída do planejamento experimental. O óleo de girassol, apesar de não ser significativo, teve efeito positivo sobre a atividade enzimática, portanto, esta variável teve o seu nível de concentração elevada para a próxima etapa do planejamento. A concentração máxima nesta etapa nível +1 (2,0% v/v) foi deslocada para a concentração mínima no planejamento seguinte nível -1,68 (2,0% v/v).

O pH não apresentou efeito significativo sobre a atividade enzimática, atuando de forma negativa (em média $4,22 \text{ U mL}^{-1}$) quando passou do nível -1 (7,0) para o nível +1 (9,0). Entretanto, como na etapa anterior o pH foi estatisticamente significativo, influenciando positivamente a atividade enzimática, essa variável foi mantida e fixada em 7,0.

A partir dos dados obtidos do planejamento fracionário 2^{5-1} foi estabelecido um planejamento delineamento composto central rotacional 2^3 (DCCR) para estudar a influência da concentração de óleo de girassol, peptona e extrato de levedura de acordo com a matriz apresentada na **Tabela 14**. O melhor resultado foi observado no ensaio 12, onde a atividade enzimática foi de $53,65 \text{ U mL}^{-1}$. Os coeficientes de regressão das variáveis e das interações entre elas estão apresentadas na **Tabela 15**.

Tabela 14: Matriz do planejamento experimental do tipo composto central rotacional 2^3 (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática).

Ensaio ^a	Óleo de girassol (mL) ^b	Peptona (g) ^b	Extrato de levedura (g) ^b	Atividade Enzimática (U mL ⁻¹)
1	0,6 (-1)	0,14 (-1)	0,06 (-1)	6,04
2	0,9 (+1)	0,14 (-1)	0,06 (-1)	2,96
3	0,6 (-1)	0,26 (+1)	0,06 (-1)	9,29
4	0,9 (+1)	0,26 (+1)	0,06 (-1)	18,63
5	0,6 (-1)	0,14 (-1)	0,09 (+1)	2,48
6	0,9 (+1)	0,14 (-1)	0,09 (+1)	0,25
7	0,6 (-1)	0,26 (+1)	0,09 (+1)	41,56
8	0,9 (+1)	0,26 (+1)	0,09 (+1)	28,79
9	0,5 (-1,68)	0,2 (0)	0,075 (0)	20,37
10	1 (1,68)	0,2 (0)	0,075 (0)	5,41
11	0,75 (0)	0,1 (-1,68)	0,075 (0)	1,89
12	0,75 (0)	0,3 (+1,68)	0,075 (0)	53,65
13	0,75 (0)	0,2 (0)	0,05 (-1,68)	23,61
14	0,75 (0)	0,2 (0)	0,1(+1,68)	29,89
15 (c)	0,75 (0)	0,2 (0)	0,075 (0)	26,89
16 (c)	0,75 (0)	0,2 (0)	0,075 (0)	15,81
17 (c)	0,75 (0)	0,2 (0)	0,075 (0)	22,90
18 (c)	0,75 (0)	0,2 (0)	0,075 (0)	25,07

^a (c) ponto central.

(-1,68), (-1), (0), (+1) e (+1,68) são níveis codificados.

Fonte: Produzida pelo autor.

Tabela 15: Coeficientes de regressão para a resposta atividade de lipase.

Variáveis	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t	p
Média	23,10257	3,978734	5,80651	0,000402
Óleo de girassol (L)	-2,48264	2,157627	-1,15064	0,283111
Óleo de girassol (Q)	-5,35804	2,244245	-2,38746	0,044030
Peptona (L)	12,71343	2,157627	5,89232	0,000365
Peptona (Q)	-0,08525	2,244245	-0,03798	0,970631
Extrato de levedura (L)	3,42355	2,157627	1,58672	0,151237
Extrato de levedura (Q)	-0,44726	2,244245	-0,19929	0,847005
Óleo de girassol X peptona	0,23477	2,817831	0,08332	0,935648
Óleo de girassol X extrato de levedura	-2,65861	2,817831	-0,94350	0,373044
Peptona X extrato de levedura	6,08755	2,817831	2,16037	0,062754

L – linear

Q- quadrático

Nível de confiança: 0,9

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos dados obtidos no DCCR 2^3 foi estabelecido um DCCR 2^2 , de acordo com a matriz apresentada na **Tabela 16**. O melhor resultado de atividade enzimática foi obtido no

ensaio 8 (215,26 U mL⁻¹). A análise do coeficiente de regressão das variáveis e das interações entre elas estão apresentadas na **Tabela 17**.

Tabela 16: Matriz do planejamento experimental do tipo composto central rotacional 2² (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática).

Ensaio ^a	Extrato de levedura (g) ^b	Peptona (g) ^b	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)
1	0,23 (-1)	1,32 (-1)	49,50
2	0,37 (+1)	1,32 (-1)	30,15
3	0,23 (-1)	1,88 (+1)	157,22
4	0,37 (+1)	1,88 (+1)	10,02
5	0,2 (-1,41)	1,6 (0)	116,22
6	0,4 (+1,41)	1,6 (0)	58,65
7	0,3 (0)	1,2 (-1,41)	23,41
8	0,3 (0)	1,2 (+1,41)	215,26
9 (c)	0,3 (0)	1,6 (0)	137,10
10 (c)	0,3 (0)	1,6 (0)	104,15
11 (c)	0,3 (0)	1,6 (0)	105,26
12 (c)	0,3 (0)	1,6 (0)	54,31
13 (c)	0,3 (0)	1,6 (0)	80,70

^a (c) ponto central.

^b (-1,41), (-1), (0), (+1) e (+1,41) são níveis codificados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 17: Coeficiente de regressão para a resposta atividade de lipase.

Variáveis	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t	p
Média	106,9263	20,61314	5,18729	0,002040
Extrato de levedura (L)	-31,0587	14,59755	-2,12766	0,077459
Extrato de levedura (Q)	-20,2760	16,36434	-1,23903	0,261602
Peptona (L)	44,8959	14,59755	3,07558	0,021786
Peptona (Q)	-4,2314	16,36434	-0,25858	0,804605
Extrato de levedura x peptona	-31,9641	20,61332	-1,55065	0,171964

L – linear

Q – quadrático

Nível de confiança: 0,9

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a realização da regressão múltipla, obteve-se a seguinte equação geral para a produção de lipase pelo fungo *T. harzianum* CBMAI 1229:

$$y = 106,92 - 32,06X_1 - 20,28X_1^2 + 44,90X_2 - 4,23X_2^2 - 31,96X_1X_2$$

Equação 1

Os efeitos das variáveis peptona e extrato de levedura influenciaram no valor de atividade enzimática, a 90,0% de confiança. A variável extrato de levedura teve efeito negativo (em média 31,05 U mL⁻¹) quando passou do nível -1,41 (0,2% m/v) para o nível +1,41 (0,4% m/v). Já a variável peptona influenciou positivamente (em média 44,89 U mL⁻¹) quando passou do nível -1,41 (1,2% m/v) para o nível +1,41 (2,0% m/v). No entanto, o efeito da interação entre extrato de levedura e peptona e os termos quadráticos não foram estatisticamente significativos. Assim, as variáveis que não foram significativas foram retiradas do sistema e foi construído um modelo ajustado incluindo apenas as variáveis codificadas significativas $p < 0,10$ e expresso pela **equação 2**.

$$y = 106,93 - 31,06X_1 + 44,90X_2$$

Equação 2

O modelo matemático da equação 2 contém dois termos lineares, nenhum termo quadrático e nenhuma interação fatorial, em que “y” é a resposta predita (atividade enzimática de lipase por mL) e X_1 e X_2 são valores codificados de extrato de levedura e peptona, respectivamente.

O modelo ajustado da superfície de resposta foi realizado sob a forma de análise de variância (ANOVA), considerando apenas os termos extrato de levedura e peptona lineares, os resultados estão demonstrados na **Tabela 18**.

Tabela 18: ANOVA para o planejamento fatorial completo 2².

Fonte de Variação	Soma dos quadrados - SQ	Graus de liberdade - GL	Quadrado médio - QM	F calculado – Fcal
Regressão	23771,38	2	11885,69	6,331797 ^a
Resíduo	16894,29	9	1877,143	
Total	40665,67	11	3696,879	

^a F_{calculado} (regressão/resíduo).

R²=0,584556.

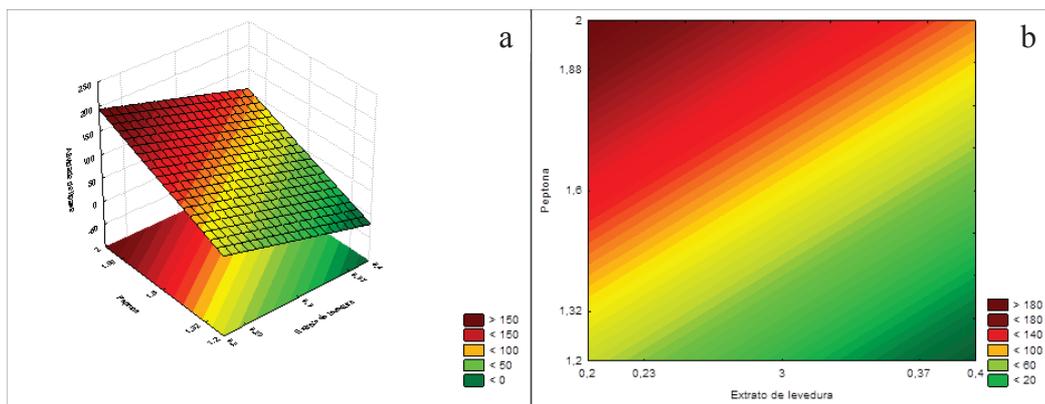
F_{0;90;2;9}=3,01.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A ANOVA do modelo de regressão demonstrou que o modelo é significativo, como é evidente pelo teste de Fisher, teste-F em que F_{calc} (6,3) é maior do que o F_t (3,01). Entretanto, o coeficiente de regressão obtido explica apenas 58,5% da regressão matemática. O baixo coeficiente de regressão obtido (R² = 58,5%) pode ser um indício de que os níveis das concentrações de extrato de levedura e peptona utilizados não foram amplos o suficiente

e, conseqüentemente, não há um bom ajuste dos valores experimentais ao modelo. Por outro lado, como o F_{cal} foi significativo, o modelo matemático pode ser utilizado para gerar o gráfico de superfície de resposta e curva de contorno a partir das variáveis codificadas (**Figura 21**), uma vez que não há um bom ajuste dos valores experimentais (reais).

Figura 21: (a) Superfície de resposta para a produção de lipase por *T. harzianum* CBMAI 1229, mostrando a interação entre extrato de levedura e peptona. (b) Curva de contorno para a produção de lipase por *T. harzianum* CBMAI 1229, mostrando a interação entre extrato de levedura e peptona.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Pela análise da **Figura 21** observa-se uma influência das concentrações de extrato de levedura e peptona na produção de lipase. A faixa de melhor produção foi determinado correspondendo a 2,0% (m/v) de peptona e 0,2% (m/v) de extrato de levedura.

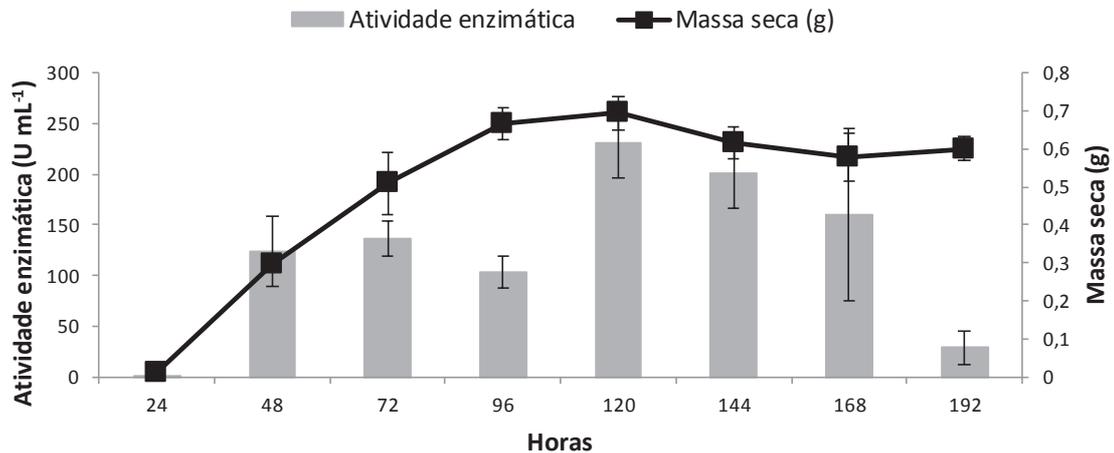
5.5.1 Validação do modelo matemático para a produção de lipase

Para validar o modelo matemático e determinar o tempo de cultivo foi realizada uma curva de crescimento acompanhado da atividade enzimática por 192 horas com as concentrações de extrato de levedura e peptona no ponto ótimo (**Figura 22**). Nas 24 horas iniciais do cultivo do fungo *T. harzianum* CBMAI 1229 foi possível identificar atividade enzimática ($1,04 \pm 0,26 \text{ U mL}^{-1}$) ao contrário da primeira curva de crescimento em que não foi possível detectar a atividade de lipase **Figura 15**. Nas horas seguintes a atividade enzimática aumentou até que houve uma queda abrupta em 96 horas de cultivo, seguido pelo pico de produção em 120 horas ($231,58 \pm 35,59 \text{ U mL}^{-1}$), e redução contínua.

A fase de crescimento exponencial do fungo *T. harzianum* CBMAI 1229 foi até 96 horas após o início do cultivo. A partir desse ponto, o crescimento estagnou e teve início a fase estacionária que desencadeou na fase de declínio (120 horas). Entre 96 e 120 horas houve um salto de produção de lipase, justamente quando o fungo estava na fase estacionária de

crescimento, possivelmente, por ter consumido toda a fonte de carbono (óleo de girassol) e, com isso, iniciou a fase de declínio.

Figura 22: Curva de crescimento acompanhado da atividade enzimática de *T. harzianum* CBMAI 1229 durante 192 horas.

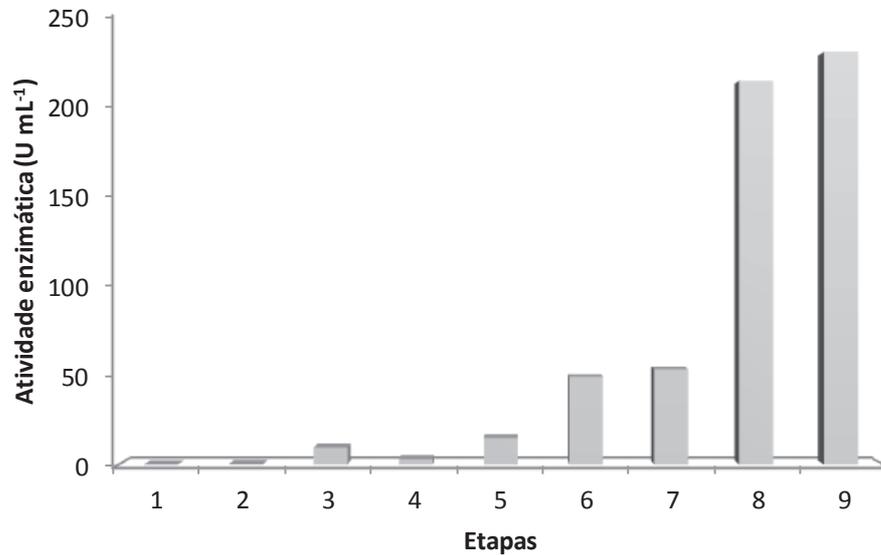


Fonte: Elaborado pelo autor.

Na validação da otimização, o pico de atividade enzimática ($231,58 \pm 35,57 \text{ U mL}^{-1}$) produzida pelo fungo marinho *T. harzianum* CBMAI 1229 foi similar ao encontrado no ensaio otimizado ($215,26 \text{ U mL}^{-1}$). A substituição dos valores correspondendo a concentração das variáveis peptona e extrato de levedura na equação 2 reportou uma resposta predita de $190,52 \text{ U mL}^{-1}$. Valor próximo ao mínimo encontrado na validação, considerando o desvio padrão, apesar do coeficiente de regressão ser abaixo de 70%.

A determinação das melhores condições para a produção de lipase pelo fungo marinho *T. harzianum* CBMAI 1229 levou a um aumento da atividade enzimática de 2931 vezes em relação às condições iniciais (**Figura 23**).

Figura 23: Evolução da produção de lipase por *T. harzianum* CBMAI 1229. 1-Seleção do melhor produtor; 2-Tempo inicial de cultivo; 3-Seleção do melhor meio mineral; 4-Primeiro planejamento experimental P&B; 5-Segundo planejamento experimental P&B; 6-Terceiro planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-1} ; 7-Quarto planejamento experimental delineamento composto central 2^3 ; 8- Quinto planejamento experimental delineamento composto central 2^2 ; 9-Validação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Ülker et al. (2011) utilizaram a metodologia de otimização um-fator-por-vez para testar diferentes fontes de carbono sobre o crescimento e produção de lipase por *T. harzianum*. O maior crescimento e atividade lipolítica ($0,24 \text{ U mL}^{-1}$) foi obtida com glicose e peptona como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente, após sete dias. Ruchi, Anshu e Khare (2008) realizaram a otimização do meio de cultura utilizando a metodologia de superfície de resposta para a produção de lipase por *Pseudomonas aeruginosa*. Os efeitos de 11 componentes do meio (peptona, triptona, NH_4Cl , NaNO_3 , extrato de levedura, glicose, xilose, glicerol, goma arábica, MgSO_4 e NaCl) foram avaliados por planejamento usando Plackett & Burman, e os fatores mais significativos (goma arábica, MgSO_4 , triptona e extrato de levedura) foram otimizados pela metodologia de superfície de resposta. Após a otimização, a produção de lipase aumentou cerca de 6 vezes, alcançando uma atividade de $4,58 \text{ U mL}^{-1}$.

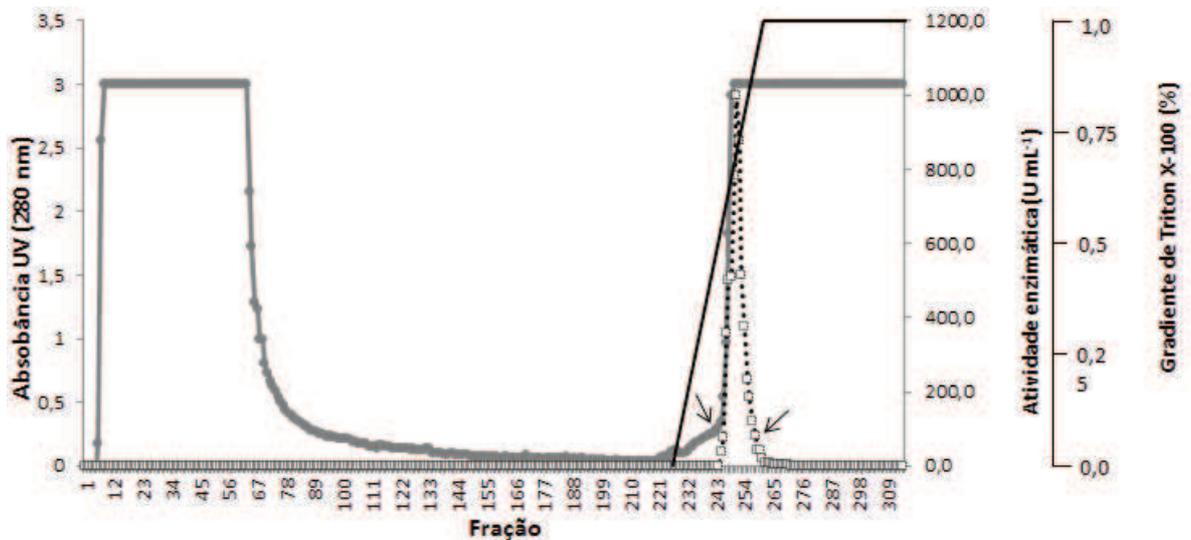
5.6 Purificação e caracterização da lipase produzida por *T. harzianum* CBMAI 1229

A purificação da lipase de *T. harzianum* CBMAI 1229 foi realizada utilizando o sobrenadante de cultura centrifugado e filtrado, o qual foi dialisado contra tampão acetato de amônio $0,05 \text{ M}$ pH $6,9$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Essa amostra foi então submetida à cromatografia de interação

hidrofóbica em coluna Octil Sepharose 4 FF, equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9. Após eluição, a coluna foi lavada com o mesmo tampão e, posteriormente, as proteínas adsorvidas foram desorvidas com um gradiente crescente de Triton X-100, de 0 a 1,0% (**Figura 24**). Nessas condições, a atividade ficou adsorvida, sendo eluída somente com 0,75% de Triton X-100. Após dosagem das atividades nas frações coletadas, aquelas que apresentaram atividade lipase foram reunidas, constituindo então a amostra de enzima purificada, pois esta preparação se mostrou homogênea em SDS-PAGE, apresentando uma banda de massa molecular correspondente a 16,1 kDa (**Figura 25**).

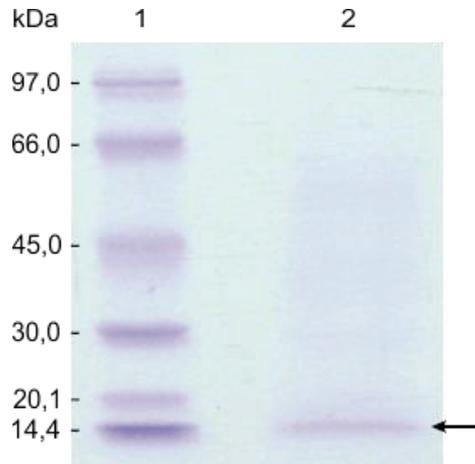
Diversas lipases de diferentes micro-organismos foram purificadas e tiveram, sua massa molecular determinadas por SDS-PAGE. Dentre elas, a massa molar de 35,5 kDa de *Aspergillus niger* (NAMBOODIRI; CHATTOPADHYAYA, 2000); outras três lipases de *Aspergillus niger* com 31, 43 e 65 kDa de (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2005); 29,0 kDa de *Rhizopus oryzae* (SALAH et al., 2006); 38 kDa de *Yarrowia lipolytica* (DARVISHI et al., 2011); 32 kDa de *Rhizopus oryzae* (HIOL et al., 2000); 90 kDa de *Aspergillus awamori* (BASHEER et al., 2011) e 29,5 kDa de *Rhizopus homothallicus* (MATEOS DIAZ et al., 2006). No entanto, não foi encontrado na literatura consultada, uma lipase fúngica com massa molar tão baixa, quanto a verificada neste estudo.

Figura 24: Perfil cromatográfico de eluição da lipase de *T. harzianum* CBMAI 1229 em cromatografia de interação hidrofóbica com Octil Sepharose equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9. (•) A280; (◐) atividade lipase (U mL⁻¹); (-) gradiente de Triton X-100; flechas indicam as frações reunidas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25: Perfil eletroforético em SDS-PAGE (8-18%) da lipase de *T. harzianum* CBMAI 1229. Da esquerda para a direita: coluna 1 contém α -lactoalbumina (14,4 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), albumina (66,0 kDa), fosforilase b (97,0 kDa). A coluna 2 contém amostra purificada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A lipase foi purificada por um procedimento prático, rápido e simples envolvendo apenas uma etapa, o que é muito interessante para ampliação em grande escala, uma vez que apresenta menor. O teor de proteínas totais foi reduzido a 11,8 mg, o que levou a um fator de purificação de 59 vezes, a atividade específica foi de 754,2 U mg⁻¹ de proteína e rendimento de cerca 85% (**Tabela 19**). Essa recuperação pode ser considerada muito boa para purificação de enzimas em geral, e até mesmo excelente quando comparada com os valores de rendimento de purificação de outras lipases. Isso também é muito importante do ponto de vista aplicado, pois elevadas recuperações em purificação de enzimas representam menores custos para produção industrial.

Tabela 19: Purificação da lipase por *T. harzianum* CBMAI 1229.

Etapa	Volume (mL)	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	Atividade Total (U)	Proteína (mg mL ⁻¹)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Filtado diálisado	158,0	66,50	10507,0	5,2	823,2	12,8	100,0	1,0
Cromatografia Octil Sepharose 4 FF	2,5	349,7	8917,9	0,5	11,8	754,2	84,9	59,1

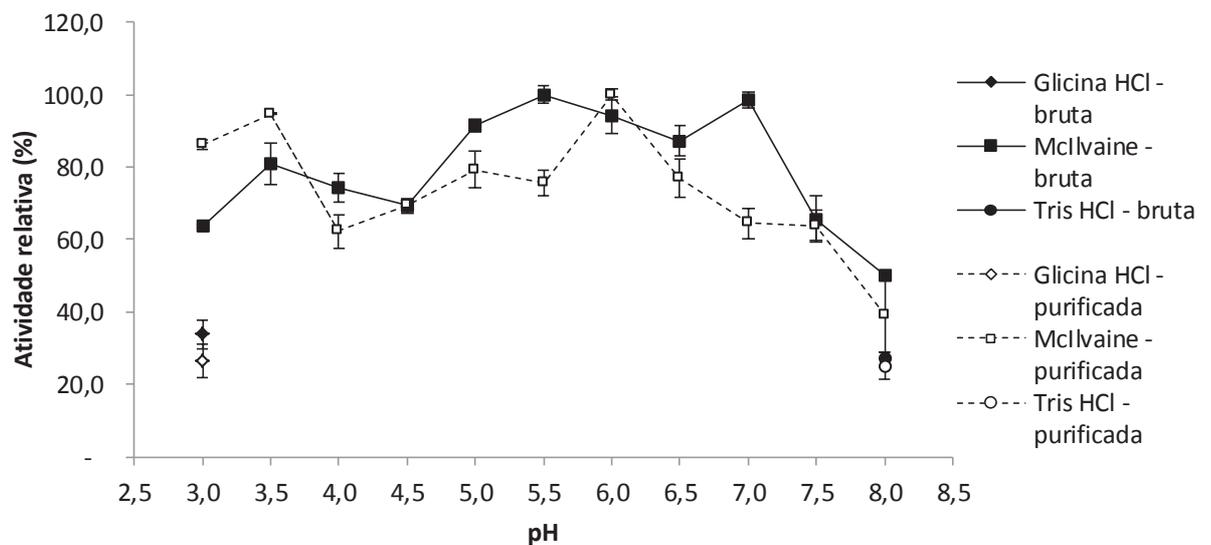
Fonte: Elaborado pelo autor.

A **Figura 26** apresenta o efeito do pH do substrato sobre a atividade hidrolítica da enzima no estado bruto e purificada na faixa de pH 3,0 a 8,0. Ambas as formas da enzima

apresentaram atividade lipase acima de 60% na faixa de pH 3,0 a 7,5 em tampão McIlvaine. A atividade da enzima reduziu no pH 3,0 e 8,0. Para abaixo de 50%, tanto para a enzima bruta quanto para enzima purificada, em tampão Glicina HCl, McIlvaine e Tris HCl. O pH ótimo para a enzima bruta foi de 5,5 com atividade de $95,5 \pm 2,3 \text{ U mL}^{-1}$ e apresentou cerca de 90% de atividade em pH 5,0 a 7,0. A atividade lipase para a enzima purificada foi de 6,0 com atividade de $542,1 \pm 8,7 \text{ U mL}^{-1}$.

O resultado de pH ótimo para a lipase no filtrado de cultura de *T. harzianum* CBMAI 1229 difere do encontrado na literatura para outra lipase produzida por *T. harzianum*, em que o mesmo foi de 8,5 (ÜLKER et al., 2011). Não há relatos na literatura consultada de estudos de purificação de lipase produzida por espécies do gênero *Trichoderma*. Uma lipase produzida por *Aspergillus awamori* de origem marinha e com pH ótimo neutro foi descrita por (BASHEER et al., 2011) com potencial aplicação em biorremediação. A enzima apresentou massa molecular de 90 kDa e alta atividade específica de 1.164 U mg^{-1} . Lipases com pH ótimo neutro ou levemente ácido também foram identificadas em *Aspergillus japonicus* (BHARTI et al., 2013), *Yarrowia lipolytica* (BRÍGIDA et al., 2014; CORZO; REVAH, 1999; SONG; JIANG; MA, 2006) e *Penicillium cyclopium* (CHAHINIAN et al., 2000), entre outras.

Figura 26: Efeito do pH sobre a atividade da lipase bruta e purificada de *T. harzianum* CBMAI 1229. A atividade foi determinada em tampão glicina NaOH 0,05 M para o pH 3, tampão McIlvaine para a faixa de 3,0 a 8,0, e tampão Tris-HCl 8,0 a 37°C. A atividade controle (100%) correspondeu a $95,49 \pm 2,29 \text{ U mL}^{-1}$ para a enzima dialisada e $542,08 \pm 8,75 \text{ U mL}^{-1}$ para a enzima purificada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6 CONCLUSÕES

- O uso de diferentes marcadores moleculares além de ITS permitiu refinar a identificação dos seis isolados de fungos até espécie; exceto para a linhagem *Fusarium* sp. CBMAI 1227.
- A metodologia de triagem dos fungos marinhos produtores de lipases em meio neutro permitiu a seleção do isolado *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229 como o melhor produtor.
- A estratégia empregada no processo de otimização da produção de enzima foi eficiente e satisfatório, elevando a produção em cerca 3.000 vezes em relação à etapa inicial de seleção.
- A lipase de *T. harzianum* CBMAI 1229 foi purificada por uma estratégia simples, rápida e prática, de apenas uma etapa, uma cromatografia de interação hidrofóbica em octil agarose. A análise por SDS-PAGE revelou que esta enzima apresenta massa molecular de 16,1 kDa. A atividade ótima desta enzima foi de pH 6,0.
- Os resultados do presente estudo demonstram o potencial para aplicação biotecnológica da lipase do fungo marinho *Trichoderma harzianum* CBMAI 1229, tanto para sua forma bruta quanto purificada, uma vez que a estratégia estabelecida é interessante para aplicação em grande escala.

REFERÊNCIAS

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.

AIRES - BARROS, M. R.; TAIPA, M. A.; CABRAL, J. M. S. Isolation and purification of lipases. In: WOOLLEY, P.; PETERSEN, S. B. (Eds.). **Lipases: their structure, biochemistry and application**. 1a. ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 1994. p. 243–270.

ALMEIDA, A. F. Produção, purificação e propriedades bioquímicas de lipase ácida de *Candida viswanathii*. [s.l.] **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho,”** 2012.

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

ANTRANIKIAN, G.; VORGIAS, C. E.; BERTOLDO, C. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. In: ULBER, R.; LE GAL, Y. (Eds.). **Advances in biochemical engineering/biotechnology: Marine Biotechnology I**. Berlin, Deutschland: Springer Berlin Heidelberg, 2005. v. 96p. 219–262.

BAHARUM, S. N.; BENG, E. K.; MOKHTAR, M. A. A. Marine Microorganisms: Potential Application and Challenges. **Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 6, p. 555–564, 1 jun. 2010.

BASHEER, S. M. et al. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: production, partial purification and application in oil effluent treatment. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 627–638, out. 2011.

BHARTI, M. K. et al. Purification and Characterization of Lipase From *Aspergillus japonicus*: A Potent Enzyme for Biodiesel Production. **National Academy Science Letters**, v. 36, n. 2, p. 151–156, 4 abr. 2013.

BOM, E. P. S. et al. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. 1a. ed. Rio de Janeiro, Brasil: Interciência, 2008. p. 506.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 73–81, mar. 2002.

BRADY, L. et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 767–770, 22 mar. 1990.

BRÍGIDA, A. I. S. et al. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 148–158, mar. 2014.

BURKERT, J. F. M.; 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.

CAJAL, Y. et al. Effect of the lipid interface on the catalytic activity and spectroscopic properties of a fungal lipase. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1053–1061, nov. 2000.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553, maio 1999.

CASAS-GODOY, L. et al. Lipases: an overview. In: SANDOVAL, G. (Ed.). **Lipases and Phospholipases. Methods in molecular biology**. [s.l.] Humana Press, 2012. v. 861p. 3–30.

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

CAVALCANTI, E. A. C. et al. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. June, p. 79–84, 2005.

CHAHINIAN, H. et al. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 215–22, fev. 2000.

CHERUKUVADA, S. L. et al. Evidence of a double-lid movement in *Pseudomonas aeruginosa* lipase: insights from molecular dynamics simulations. **PLoS Computational Biology**, v. 1, n. 3, p. 28, ago. 2005.

CHOI, S.-J.; HWANG, J. M.; KIM, S. IL. A colorimetric microplate assay method for high throughput analysis of lipase activity. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 4, p. 417–420, 31 jul. 2003.

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.

COLIN, V. L.; BAIGORI, M. D.; PERA, L. M. Effect of environmental conditions on extracellular lipases production and fungal morphology from *Aspergillus niger* MYA 135. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 52–58, fev. 2010.

COLIN, V. L.; BAIGORÍ, M. D.; PERA, L. M. Mycelium-bound lipase production from *Aspergillus niger* MYA 135, and its potential applications for the transesterification of ethanol. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 236–242, jun. 2011.

COLWELL, R. R. Fulfilling the promise of biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 3-4, p. 215–228, nov. 2002.

CONTESINI, F. J. et al. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 3-4, p. 163–171, dez. 2010.

CORZO, G.; REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 2, p. 173–180, nov. 1999.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods in Enzymology**, v. 284, n. 1992, p. 3–27, jan. 1997.

CZITROM, V. One-Factor-at-a-Time versus Designed Experiments. **The American Statistician**, v. 53, n. 2, p. 126–131, maio 1999.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. DA G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, ago. 2004.

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, 1 jun. 2000.

DARVISHI, F. et al. High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 756–760, out. 2011.

DAVRANOV, K.; KHALAMEIZER, V. B. Current state of the study of microbial lipases. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 33, n. 2, p. 113–126, mar. 1997.

DEBASHISH, G. et al. Marine enzymes. In: ULBER, R.; LE GAL, Y. (Eds.). **Advances in biochemical engineering/biotechnology: Marine biotechnology I**. Berlin, Deutschland: Springer Berlin Heidelberg, 2005. v. 96p. 189–218.

DEREWENDA, U. et al. An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases. **Nature Structural Biology**, v. 1, n. 1, p. 36–47, jan. 1994a.

DEREWENDA, U. et al. Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. **Journal of Lipid Research**, v. 35, n. 3, p. 524–534, mar. 1994b.

DRUZHININA, I. S. et al. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. **Fungal Genetics and Biology : FG & B**, v. 42, n. 10, p. 813–28, out. 2005.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 6. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 436

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Purification of different lipases from *Aspergillus niger* by using a highly selective adsorption on hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 92, n. 6, p. 773–9, 20 dez. 2005.

FERRAREZI, A. L. Seleção de fungos termofílicos para produção de lipase e aplicação na produção de biodiesel. Rio Claro: **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho,”** 2011.

FERRER, M. et al. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 75, n. 7, p. 569–576, jul. 2000.

FERRER, P. et al. Production of native and recombinant lipases by *Candida rugosa*: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 221–255, set. 2001.

FICKERS, P. et al. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 4, p. 742–749, abr. 2004.

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Lipases em biocatálise. In: **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. 1a. ed. Rio de Janeiro, Brasil: Interciência, 2008. p. 506.

GAL-HEMED, I. et al. Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5100–9, ago. 2011.

GARCIA, A. K. Avaliação da atividade lipolítica de fungos filamentosos da costa brasileira. [s.l.] **Universidade de São Paulo**, 2010.

GERARDO, N. M. et al. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. **Proceedings. Biological Sciences/The Royal Society**, v. 271, n. 1550, p. 1791–8, 7 set. 2004.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323–30, abr. 1995.

GOCHEV, V. et al. Nutritive medium engineering enhanced production of extracellular lipase by *Trichoderma longibrachiatum*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 26, n. 2, p. 2875–2882, 2012.

GRÄFENHAN, T. et al. An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. **Studies in Mycology**, v. 68, p. 79–113, jan. 2011.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. Second ed. New York, United State: Wiley-Liss, 1994. p. 458

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95–98, 1999.

HARMAN, G. E. et al. Special issue: *Trichoderma*--from basic Biology to Biotechnology. **Microbiology (Reading, England)**, v. 158, n. Pt 1, p. 1–2, jan. 2012.

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

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus* sp. FH5. **Annals of Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 247–252, set. 2006b.

HERMOSA, M. R. et al. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1890–8, maio 2000.

HIOL, A et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 5-6, p. 421–430, 1 mar. 2000.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175–186, abr. 2004.

HOLMQUIST, M. et al. Lipases from *Rhizomucor miehei* and *Humicola lanuginosa*: modification of the lid covering the active site alters enantioselectivity. **Journal of Protein Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 749–757, dez. 1993.

HOLMQUIST, M. et al. Probing a functional role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase through transesterification reactions in organic solvent. **Journal of Protein Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 217–224, maio 1995.

HOLMQUIST, M. Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. **Current Protein & Peptide Science**, v. 1, n. 2, p. 209–35, set. 2000.

HOLMQUIST, M.; NORIN, M.; HULT, K. The role of arginines in stabilizing the active open-lid conformation of *Rhizomucor miehei* lipase. **Lipids**, v. 28, n. 8, p. 721–726, ago. 1993.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155–170, 2004.

HOUGH, D. W.; DANSON, M. J. Extremozymes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, n. 1, p. 39–46, fev. 1999.

HUNTER-CEVERA, J.; KARL, D.; BUCKLEY, M. Marine Microbial diversity: the key to earth's habitability. **American Academy of Microbiology**, p. 1–22, 2005.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315–351, jan. 1999.

JOSEPH, B. et al. Standard review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 2, p. 39–48, 2007.

JURJEVIĆ, Z. et al. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air. **IMA fungus**, v. 3, n. 2, p. 159–173, dez. 2012.

KAISER, M. J. et al. **Marine ecology: processes, systems and impacts**. 2a. ed. New York, USA: Oxford university press, 2011. p. 528

KASHMIRI, M. A.; ADNAN, A.; BUTT, B. W. Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma Viride*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 878–882, 2006.

KATO, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, abr. 2013.

KAUSHIK, R. et al. Optimization of lipase production from *Aspergillus terreus* by response surface methodology and Its potential for synthesis of partial glycerides under solvent free conditions. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 456–462, out. 2010.

KIM, J.-T. et al. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 4, p. 820–828, mar. 2007.

- KOHLMEY, J. V. **On the definition and taxonomy of higher marine fungi**. Suppl. 5 ed. Bremerhaven: Veroff. Intitute Meeresforsch, 1974. p. 263–286
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 15 ago. 1970.
- MAIA, M. D. M. D. et al. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 4, p. 304–309, dez. 1999.
- MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 1–14, mar. 1994.
- MARTINELLE, M.; HULK, K. Kinetics of triglyceride lipase. In: WOOLLEY, P.; PETERSEN, S. B. (Eds.). **Lipases: their structure, biochemistry and application**. 1a. ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 1994. p. 159–180.
- MATEOS DIAZ, J. C. et al. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1042–1050, set. 2006.
- MENDES, A. A. et al. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296–305, mar. 2005.
- MENEZES, C. B. A et al. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 466–482, 20 ago. 2010.
- MOAT, A. G.; FOSTER, J. W. **Microbial Physiology**. Second ed. Singapore: Wiley, 1988. p. 597
- MUNN, C. C. (ED.). **Marine microbiology: ecology & applications**. 1. ed. [S.I.]: BIOS Scientific Publishers, 2004. p. 274
- NAHAS, E. Control of Lipase Production by *Rhizopus oligosporus* under Various Growth Conditions. **Microbiology**, v. 134, n. 1, p. 227–233, 1 jan. 1988.
- NAMBOODIRI, V. M.; CHATTOPADHYAYA, R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. **Lipids**, v. 35, n. 5, p. 495–502, maio 2000.
- NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. **Current opinion in structural biology**, v. 9, n. 6, p. 732–737, dez. 1999.
- OLLIS, D. L. et al. The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 5, n. 3, p. 197–211, 1992.
- OLSON, B. H.; JOHNSON, M. J. Factors producing high yeast yields in synthetic media. **Journal of Bacteriology**, v. 57, n. 2, p. 235–246, ago. 1948.
- OSTERHAGE, C. et al. Rare sesquiterpenes from the algalicolous fungus *Drechslera dematioidea*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 3, p. 306–313, mar. 2002.
- PALOMO, J. M. et al. Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 2, p. 630–635, 2004a.
- PALOMO, J. M. et al. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, n. 1-2, p. 267–273, 4 jul. 2004b.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93–99, fev. 2006.
- PERA, L. M. et al. Catalytic Properties of Lipase Extracts from *Aspergillus niger*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 247–252, 2006.
- PESSOA, A. J.; KILIKIAN, B. V. Introdução. In: PESSOA, A. J.; KILIKIAN, B. V. (Eds.). **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri, Brasil: [s.n.], p. 1–5.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 67–80, jul. 1998.

PODAR, M.; REYSENBACH, A.-L. New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 250–255, jun. 2006.

RAGHUKUMAR, C. et al. Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 433–441, out. 2004.

RAGHUKUMAR, C. Diversity and adaptations of deep-sea microorganisms. **Microbial Diversity: Current Perspectives and ...**, p. 1–23, 2005.

REIS, P. et al. Lipases at interfaces: a review. **Advances in colloid and interface science**, v. 147-148, p. 237–50, 2009.

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

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e orimização de processos. Uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1ª. ed. Campinas, Brasil. Casa do Pão de Queijo, 2005. p. 326.

RUCHI, G.; ANSHU, G.; KHARE, S. K. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: production optimization by response surface methodology and application. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4796–802, jul. 2008.

SALAH, R. BEN et al. Biochemical and molecular characterization of a lipase produced by *Rhizopus oryzae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 260, n. 2, p. 241–8, jul. 2006.

SALAMEH, M. A.; WIEGEL, J. Purification and characterization of two highly thermophilic alkaline lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 23, p. 7725–7731, dez. 2007a.

SALAMEH, M.; WIEGEL, J. Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 61, n. 06, p. 253–283, jan. 2007b.

SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; BRASI, M. **New Lipases and Proteases**. New York, United States: Nova Science Publishers, 2006. p. 159

SAMUELS, G. J. et al. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 146–170, 2002.

SANTOS VAZ, M. S. Caracterização do gene lip2 de *Trichoderma harzianum*. [s.l.] **Escola Superior Agrária de Bragança**, 2010.

SÁ-PEREIRA, P. et al. Biocatálise: estratégias de inovação e criação de mercados. In: BOM, E. P. S. et al. (Eds.). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. 1a. ed. Rio de Janeiro, Brasil: Interciência, 2008. p. 433–462.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, n. 3, p. 513–521, dez. 1958.

SAVITHA, J. et al. Identification of potential fungal strain (s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 564–568, 2007.

SAXENA, R. K. et al. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 101–115, 1999.

SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Lipases and alpha/beta hydrolase fold. **Methods in Enzymology**, v. 284, n. 1973, p. 85–107, jan. 1997.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787–99, jul. 2010.

SEIFERT, K. et al. **The genera of hyphomycetes**. Utrecht, Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2011. p. 997

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.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486–520, jan. 2012.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, out. 1985.

SONG, H.-T.; JIANG, Z.-B.; MA, L.-X. Expression and purification of two lipases from *Yarrowia lipolytica* AS 2.1216. **Protein Expression and Purification**, v. 47, n. 2, p. 393–7, jun. 2006.

SUBRAMANIAN, A. Marine Environment. In: T., B.; K., K.; S., A. K. (Eds.). **Training Course on Mangroves and Biodiversity**. 1. ed. [S.I.]: United Nations University, 2012. p. 8.

SVENDSEN, A. Lipase protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, n. 2, p. 223–238, 29 dez. 2000.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–9, dez. 2013.

TAN, T. et al. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1495–1502, jul. 2004.

TRINCONE, A. Potential biocatalysts originating from sea environments. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 3-4, p. 241–256, out. 2010.

TRINCONE, A. Marine biocatalysts: enzymatic features and applications. **Marine Drugs**, v. 9, n. 4, p. 478–499, jan. 2011.

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

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in Mycology**, v. 69, n. 1, p. 57–80, 30 jun. 2011.

VERGER, R. “Interfacial activation” of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32–38, jan. 1997.

VITA-MARQUES, A. M. DE et al. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1099–1103, 2008.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbiology Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42–43, 1956.

WEI, Y. et al. Structure of a microbial homologue of mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases: *Streptomyces exfoliatus* lipase at 1.9 Å resolution. **Structure**, v. 6, n. 4, p. 511–519, 15 abr. 1998.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. et al. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. London, United Kingdom: Academic Press, 1990. p. 315–322.

YADAV, K. N. S. et al. Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10663–10670, nov. 2011.

YANG, J. et al. Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through in vitro combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site. **Protein Engineering**, v. 15, n. 2, p. 147–152, fev. 2002.

ZAMBIAZI, R. C. et al. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 111–120, 2007.

ZHANG, C.; KIM, S.-K. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. **Marine Drugs**, v. 8, n. 6, p. 1920–1934, jan. 2010.

ZHANG, C.; KIM, S.-K. Application of marine microbial enzymes in the food and pharmaceutical industries. In: **Advances in Food and Nutrition Research**. 1. ed. San Diego, U.S.A.: Elsevier Inc., 2012. v. 65p. 423–435.