

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE, PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA**

**PROSPECÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS EM FUNGOS  
PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

**Autora: Dâmaris Hadassa Rangel Fonseca Bessa  
Orientador: Carlos Frederico de Souza Castro**

**RIO VERDE – GO  
Dezembro – 2019**

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE, PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**PROSPECÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS EM FUNGOS  
PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Autor: Dâmaris Hadassa Rangel Fonseca Bessa  
Orientador: Carlos Frederico de Souza Castro

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de concentração Agroquímica

**Rio Verde – GO  
Dezembro – 2019**

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

B557p Bessa, Dâmaris Hadassa Rangel Fonseca  
Prospecção de Enzimas Lipolíticas em Fungos para  
Produção de Biodiesel / Dâmaris Hadassa Rangel Fonseca  
Bessa; orientador Carlos Frederico de Souza Castro;  
co-orientador Danilo Luiz Flumignan. -- Rio Verde,  
2019.  
51 p.

Dissertação ( em Programa de Pós-Graduação em  
Agroquímica) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio  
Verde, 2019.

1. Lipases. 2. Paecilomyces formosus. 3.  
Aspergillus tubingensis. I. Castro, Carlos Frederico  
de Souza, orient. II. Flumignan, Danilo Luiz , co-  
orient. III. Título.

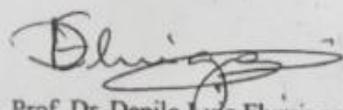
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**PROSPECÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS EM  
FUNGOS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

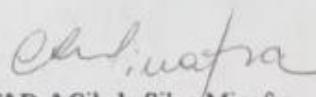
Autora: Dâmaris Hadassa Rangel Fonseca Bessa  
Orientador: Carlos Frederico de Souza Castro

*TITULAÇÃO:* Mestre em Agroquímica – Área de concentração  
Agroquímica.

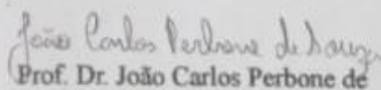
APROVADA em 09 de dezembro de 2019.



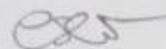
Prof. Dr. Danilo Luiz Flumignan  
*Avaliador externo*  
IFMT- Campus Cuiabá



Prof.ª Dr.ª Cibele Silva Minafra  
*Avaliadora externa*  
IF Goiano – Campus Rio Verde



Prof. Dr. João Carlos Perbone de  
Souza *Avaliador interno*  
IF Goiano - Campus Rio Verde



Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza  
Castro *Presidente da banca*  
IF Goiano - Campus Rio Verde

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e sabedoria concedida para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos, pela orientação segura, pelo apoio, disponibilidade e prontidão.

Ao meu esposo Luiz Gustavo, por ter suportado junto comigo todas as dificuldades e ter ficado ao meu lado sempre que precisei de apoio e por não me ter deixado desistir, agradeço pelo sustento, carinho e paciência.

Agradeço a meus pais Uberlândio e Sirlei, meu irmão André, minha cunhada Juliana e meu sobrinho Samuel, que são a minha inspiração e a minha base, pelo amor incondicional.

Aos meus amigos de mestrado, Amanda e Fernando, que me ajudaram sempre quando eu precisei de um local para ficar e pelo companheirismo. Ao Antônio, que me ajudou nos experimentos e na escrita de artigos.

A todos os colegas do laboratório de Química e Tecnologia do IFGoiano de Rio Verde.

Ao laboratório de Microbiologia de Zootecnia do IFGoiano de Rio Verde e ao laboratório de Analítica do IFSP – Campus Matão, principalmente ao Professor Dr. Danilo, pela ajuda e conselhos.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

## BIBLIOGRAFIA DA AUTORA

Dâmaris Hadassa Rangel Fonseca Bessa, brasileira, natural de Uruaçu – GO, filha de Uberlândio Novaes Fonseca e Sirlei Rangel Silva Fonseca, formada no ensino superior em Tecnologia em Biocombustíveis pelo Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Matão, tenho estágio no Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade em Biocombustíveis, Petróleo e Derivados, em Araraquara – SP, atuei na empresa Louis Dreyfus Company como analista de laboratório Jr.

*“Mas a sabedoria que vem do alto é, primeiramente,  
pura, depois, pacífica, moderada, tratável,  
cheia de misericórdia e de bons frutos,  
sem parcialidade e sem hipocrisia.”*  
Tiago 3:17

## ÍNDICE GERAL

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	1
Referências bibliográficas.....	5
2. OBJETIVOS .....	8
3. CAPÍTULO I .....	9
Avaliação de Atividade Específica Lipolítica em Fungos coletados do Bagaço de Cana-de-açúcar .....	9
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
3.1 Introdução .....	11
3.2 Material e métodos.....	13
3.2.1 Cultivo e replicação dos fungos.....	13
3.2.2 Produção do caldo enzimático .....	13
3.2.3 Quantificação de lipases .....	13
3.2.3.1 Quantificação do teor de proteínas .....	13
3.2.3.2 Quantificação da atividade lipolítica .....	14
3.2.4 Análise estatística .....	15
3.3 Resultados.....	15
3.3.1 Fermentação líquida.....	15
3.4 Discussão .....	20
3.5 Conclusão.....	22
3.6 Referências Bibliográficas .....	22
4. CAPÍTULO II .....	25
Produção de ésteres metílicos a partir de lipases de fungos lipolíticos .....	25
RESUMO.....	25
ABSTRACT.....	26
4.1 Introdução .....	27
4.2 Material e métodos.....	28
4.2.1 Produção do caldo bruto enzimático.....	28
4.2.2 Quantificação de atividade lipolítica .....	28
4.2.3 Teor de proteínas .....	29
4.2.4 Atividade volumétrica lipolítica e atividade específica de lipase.....	29
4.2.5 Produção de biodiesel .....	30
4.2.6 Análise de ésteres e estudo estatístico .....	30
4.3 Resultados e discussão.....	31
4.4 Conclusão.....	38
4.5 Referências bibliográficas.....	38
5. Conclusão Geral.....	40

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<b>Capítulo I</b>	
<b>Tabela 1</b> – Valores médios para os teores de proteínas expressos em ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).....	16
<b>Tabela 2</b> – Valores médios para as atividades lipolíticas volumétricas expressos em ( $\text{U mL}^{-1}$ ).....	17
<b>Tabela 3</b> – Valores médios para as atividades lipolíticas específicas expressos em ( $\text{U mg}^{-1}$ ).....	19
<b>Tabela 4</b> – Atividades lipolíticas específicas em ( $\text{U mg}^{-1}$ ) presentes na literatura.....	20
 <b>Capítulo II</b>	
<b>Tabela 1</b> – Valores de delineamento experimental fatorial .....	30
<b>Tabela 2</b> – Quantificação da atividade lipolítica.....	31
<b>Tabela 3</b> – Análise de variância da interação dos três fatores na produção de teores médios de ésteres.....	33
<b>Tabela 4</b> – Teste de <i>Tukey</i> dos desdobramentos dos fungos dentro dos níveis ROM e percentagem enzimática ( $\text{Enz}\%$ ).....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Capítulo I	
<b>Figura 1</b> - Representação da reação com <i>p</i> -NPB catalisada por lipase.....	15
<b>Figura 2</b> - <i>Paecilomyces parvisporus</i> em desenvolvimento em meio mineral contendo azeite de oliva como única fonte de carbono.....	16
Capítulo II	
<b>Figura 3</b> - Gráfico normal dos efeitos padronizados ( $p=5\%$ ), a linha vermelha divide os efeitos negativos dos positivos.....	36
<b>Figura 4</b> – Gráfico de pareto para efeitos padronizados ( $p=5\%$ ) das lipases do fungo <i>Paecilomyces formosus</i> II.....	36
<b>Figura 5</b> - Gráfico de contorno da interação percentagem de enzima e ROM das lipases do fungo <i>Paecilomyces formosus</i> II. N2A: <i>Paecilomyces formosus</i> II.....	37

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

pH: potencial hidrogeniônico

$\lambda$ : Comprimento de onda

Abs: absorbância

*p*-NPB: butirato de *p*-nitrofenil

*p*-NPL: laurato de *p*-nitrofelil

*p*-NPP: palmitato de *p*-nitrofenil

BDA: batata, dextrose, ágar

rpm: rotação por minuto

UV-*Vis*: ultravioleta visível

nm: nanômetro

T.P.: teor de proteínas

A.V.: atividade volumétrica

A.E.: atividade lipolítica específica

EN: norma europeia

ROM: razão molar óleo:metanol

ANOVA: análise de variância

## RESUMO

BESSA, DÂMARIS HADASSA RANGEL FONSECA BESSA. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde – GO, dezembro de 2019 **Prospecção de enzimas lipolíticas em fungos para a produção de biodiesel**. Orientador: Carlos Frederico de Souza Castro. Coorientadores: Mariana Costa Mello Gonçalves e Danilo Luiz Fluminian.

As lipases são enzimas capazes de catalisar lipídeos. Vários estudos vêm surgindo sobre essas enzimas, pois elas têm um grande campo de aplicabilidade, e sua obtenção a partir de fungos lipolíticos faz com que seu custo diminua em comparação com outros tipos de catalisadores. Um dos campos em que elas atuam é na transesterificação de triacilgliceróis, quebrando ligações e formando ésteres. Dezesete fungos do bagaço de cana-de-açúcar foram cultivados em fermentação submersa, utilizando como única fonte de carbono azeite de oliva extra-virgem. No caldo produzido, foram analisadas as atividades específicas de cada fungo através do substrato *p*-NPB com o método colorimétrico. O caldo bruto enzimático dos melhores fungos foi colado para reagir com óleo de soja e metanol em proporções estabelecidas por um delineamento composto com ponto central, obtendo ésteres metílicos, que foram quantificados por cromatografia gasosa. O estudo obteve alguns fungos promissores como *Paecilomyces formosus* (primeiro isolado), *Paecilomyces formosus* (segundo isolado) e *Aspergillus tubingensis*, capazes de crescer em meio contendo uma única fonte de carbono, o azeite de oliva, conseguindo utilizar o substrato *p*-NPB e obter atividades lipolíticas máximas de 9,268 U mg<sup>-1</sup>, 7,032 U mg<sup>-1</sup> e 6,447 U mg<sup>-1</sup> de proteína, respectivamente. O extrato enzimático bruto adicionado em meio reacional com óleo:metanol em diferentes proporções obteve uma conversão máxima de 41,60% de ésteres metílicos. Conclui-se que esses fungos têm uma atividade específica alta de lipases e conseguem catalisar compostos lipídicos, produzindo ésteres metílicos, podendo ter ampla aplicabilidade em outros setores da indústria.

Palavras-chave: Lipases; *Paecilomyces formosus*; *Aspergillus tubingensis*

## ABSTRACT

BESSA, DÂMARIS HADASSA RANGEL FONSECA BESSA. Goiano Federal Institute - Rio Verde Campus - GO, December 2019 **Prospecting Lipolytic Enzymes In Fungi For Biodiesel Production**. Advisor: Carlos Frederico de Souza Castro. Coordinators: Mariana Costa Mello Gonçalves e Danilo Luiz Flumingan.

Lipases are enzymes capable of catalyzing lipids, several studies have been emerging about these enzymes because they have a large field of applicability, and their obtaining from lipolytic fungi causes their cost to decrease compared to other types of catalysts. One of their fields is transesterification of triglycerides, breaking bonds and forming esters. Seventeen fungi from sugarcane bagasse were cultivated in submerged fermentation, using extra virgin olive oil as the sole carbon source, and the broth produced were analyzed for specific activities of each fungus through the *p*-NPB substrate with the colorimetric method. , the enzymatic broth of the best fungi was glued to react with soybean oil and methanol in proportions established by a central point composite design, obtaining methyl esters that were quantified by gas chromatography. The study obtained some promising fungi *Paecilomyces formosus* (first isolate), *Paecilomyces formosus* (second isolate) and *Aspergillus tubingensis*, they are able to grow in medium containing a single carbon source, olive oil, and can utilize the *p*-NPB substrate. and obtain maximum lipolytic activities of 9,268 U mg<sup>-1</sup>, 7,032 U mg<sup>-1</sup> and 6,447 U mg<sup>-1</sup> of protein respectively. The crude enzyme extract added in oil: methanol reaction medium in different proportions obtained a maximum conversion of 41.60% of methyl esters. In conclusion, these fungi have a high lipase specific activity and can catalyze lipid compounds producing methyl esters and may have wide applicability in other industry sectors.

Keywords: Lipases; *Paecilomyces formosus*; *Aspergillus tubingensis*

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem sido desenvolvida uma busca por tecnologias que causem menores impactos ao meio ambiente. Na Conferência das Nações Unidas sobre Mudança Climática, COP, buscou-se alcançar acordos internacionais sobre o clima, com o objetivo de manter o aumento do aquecimento global abaixo dos 2°C (CONFERÊNCIA DAS PARTES, COP-21). Esse acordo foi aprovado por 195 países, incluindo o Brasil, que, de acordo com a Nações Unidas, comprometeu-se a reduzir, em 2025, as emissões de gases de efeito estufa em 37% abaixo de níveis de 2005. Com isso, o país definiu aumentar a energia sustentável em 18% até 2030, reflorestar 12 milhões de hectares e alcançar uma participação estimada de 45% de energias renováveis em 2030 2°C (CONFERÊNCIA DAS PARTES, COP-21). Como consequência, as reações que necessitam de catalisadores têm sido estudadas no sentido de serem utilizados catalisadores renováveis. As enzimas de microrganismos são exemplos de biocatalisadores que causam menores impactos ambientais.

As enzimas são catalisadores capazes de acelerar reações químicas. As enzimas geralmente são classificadas com o sufixo “ase” de acordo com as reações que elas catalisam, como, por exemplo, enzimas que catalisam ureia são chamadas de urease. Esses catalisadores biológicos apresentam uma eficiência catalítica extraordinária, em geral, muito maior que a de catalisadores sintéticos ou inorgânicos (NELSON; COX; LEHNINGER, 2013). As enzimas se enquadram com um diferencial e vantagens em relação aos catalisadores químicos, por terem alta seletividade, catalisando um único tipo de substrato, sendo também biodegradáveis, causando quase nenhum prejuízo ao meio ambiente.

O mercado tecnológico vem crescendo e ampliando o uso dessas lipases em alimentos, produtos fármacos e na indústria química, isso ocorrendo pela capacidade de as lipases catalisarem reações de transesterificação, esterificação, aminólise e lactonização (KAPTUROWSKA *et al.*, 2012). Uma das formas de obtenção dessa enzima é através de microrganismos como fungos, leveduras e bactérias, que conseguem produzir lipases por meio de fermentação sólida ou submersa, apresentando, em geral, estabilidade térmica e tolerância ao metanol, por meio de hidrólise e esterificação (ABD-ALLA *et al.*, 2015).

A presença de halos fluorescentes por intermédio da rodamina B consegue comprovar que os microrganismos são capazes de produzir lipases, devendo ser cuidadosa a forma de cultivo de fungos para sua identificação, pois eles podem apresentar estresse no meio em que são cultivados, sendo necessárias quantidades ideais de água, pH e temperatura para poder estimular o crescimento do microrganismo e a produção de enzimas lipolíticas (GEOFFRY; ACHUR, 2018). A quantificação de lipases pode ser feita por diversos processos, entre eles, por titulação volumétrica, que, pela relação ácido:base, consegue determinar a quantidade de ácidos graxos livres no meio (CARVALHO *et al.*, 2005). O método de espectrofotometria também é bastante utilizado, apesar de ser mais caro pelo preço dos reagentes, sendo necessário um substrato, que, na reação com a lipase, libere um cromóforo, que dará cor característica ao meio, podendo, através da absorvância (Abs) e de um determinado comprimento de onda ( $\lambda$ ), quantificar, especificamente, as enzimas no meio. Laurato de *p*-nitrofenil (*p*-NPL), butirato de *p*-nitrofenil (*p*-NPB) e palmitato de *p*-nitrofenil (*p*-NPP) (BRAGA, 2009) são alguns substratos que podem ser utilizados.

Essas enzimas atuam sobre os lipídeos e também podem ser aplicadas na produção de biodiesel. Elas surgem como aceleradores da reação de transesterificação por meio de moléculas de triacilglicerol na presença de um álcool, formando biodiesel (novo éster). Esse processo é considerado mais limpo se comparado aos catalisadores químicos, pois provém de material biológico, que é facilmente degradado, além de o biodiesel ser favorecido pela sua baixa emissão de poluentes em comparação com os combustíveis fósseis (AHMAD *et al.*, 2019). Na obtenção de ésteres metílicos, as lipases podem ser usadas tanto imobilizadas quanto líquidas, tendo essa última a vantagem de menor custo na aquisição em relação às imobilizadas, tendo melhor mistura com os reagentes, não havendo uma fase sólida no meio da reação, mas enfrenta um problema em reutilização em razão da complicação ao recuperar, pois na fase líquida pode ocorrer presença de álcool e glicerol (ANDRADE *et al.*, 2019).

O biodiesel pode ser obtido de diferentes matérias-primas renováveis, como o óleo de soja, milho, colza, gordura animal, entre outros, sendo o Brasil e os Estados Unidos da América os maiores produtores desse biocombustível, considerado um combustível mais limpo pelo fato de as oleaginosas realizarem o sequestro do carbono (SHAH, 2019). O biodiesel é produzido a partir de uma matéria-prima oleaginosa, ou

gordurosa, que tem diferentes ácidos graxos, na presença de um álcool e uma enzima para acelerar o processo (MARÍN-SUÁREZ *et al.*, 2019). A aplicabilidade das lipases em biodiesel faz com que o Brasil seja o segundo maior produtor de biocombustíveis do mundo, ficando atrás apenas dos EUA, segundo dados da *British Petroleum (BP) Statistical Review of World Energy*.

Outro ramo de aplicabilidade dessas enzimas é nos fármacos, que, segundo alguns estudiosos (DANINO *et al.*, 2016), para que se ocorra a hidrólise da gordura dietética, é essencial a presença da enzima lipase pancreática. Na indústria farmacêutica, existem medicamentos à base de lipases, capazes de tratar doenças causadas, muitas vezes, pela falta de enzimas no corpo, como a fibrose cística, a pancreatite, a insuficiência exócrina no pâncreas, além também de serem eficazes no controle de diarreia com excesso de gordura. Em produtos cosméticos, as enzimas são amplamente utilizadas para o tratamento de cabelos oleosos, clareamento de pele e até mesmo para o tratamento de celulites. Um extrato enzimático contendo lipases pode ser utilizado para o controle de oleosidade, proteases para esfoliação e as oxidases para o clareamento da pele, podendo assim proceder a um tratamento de pele eficaz, sendo esse conjunto enzimático baseado na patente WO 2006/018048 A1 (LORENZETTI, 2007). Outro campo é o uso da lipase com um custo comercialmente relevante utilizada em detergentes, extraída do fungo *Humicola lanuginosa*, com aplicação do gene em *Aspergillus oryzae*. Atualmente, alguns estudos mostram que as espécies *Penicillium canesense* e *Pseudomonas cusroseus* podem ter suas enzimas aplicadas em detergentes, com alto potencial para serem incluídas na formulação do produto (SAHAY; CHOUHAN, 2018). Esses detergentes são bastante utilizados para limpeza de materiais cirúrgicos e contêm, geralmente, em sua fórmula, amilase, lipase, protease e carbohidrase.

Em razão desse amplo campo de aplicabilidade, há um crescimento no mercado enzimático. A Market Research Report on Global Agricultural Enzymes Industry (2017) demonstrou que o crescimento financeiro de enzimas pode chegar até 7,4% ao ano até o período de 2021, contando com um investimento de 2,94 bilhões de dólares.

A obtenção dessas lipases é feita por microrganismos, sendo que o processo biológico de fungos como o saprofitismo, o parasitismo e a interação com plantas está

relacionado com a capacidade de secretar enzimas para o meio extracelular, e essa quantidade de enzimas produzidas para qualquer microrganismo é altamente determinada pela fonte de carbono disponível (COLOGNA *et al.*, 2018). Pesquisadores demonstraram que *P. echinulatum* consegue produzir diferentes enzimas, sendo a quantidade influenciada pela fonte de carbono presente no meio. Esses pesquisadores utilizaram bagaço de cana-de-açúcar, celulose, glicose e glicerol, fizeram uma comparação e constataram que o meio de cultura com celulose apresentou maior atividade enzimática, seguido do glicerol (SCHNEIDER *et al.*, 2018). Outro estudo (TURATI *et al.*, 2019) obteve maior produção de lipases de *Penicillium* sp., utilizando como fonte de carbono o azeite de oliva, tendo sido observada atividade enzimática máxima com decanoato de *p*-nitrofenila como substrato.

Diferentes fontes de carbono podem ser utilizadas para a produção de lipases através de fungos lipolíticos como o óleo de palma em fermentação submersa, com diferentes concentrações de inóculos, chegando a valores ótimos de lipases de 1,327 U mL<sup>-1</sup>, obtido quando utilizado 3% (v / v) de inóculo, 4 µM de íon Ca<sup>2+</sup>, 0,4% (v / v) de azeite, 0,9% (m / v) de peptona e 0,9% de *Tween* 80 adicionados ao meio (HERMANSYAH *et al.*, 2018). Essas enzimas obtidas por diferentes fontes podem apresentar diferentes propriedades, como a fermentação submersa e sólida, em que as lipases obtidas por fermentação submersa apresentam maior estabilidade à temperatura e ao pH do que as lipases obtidas por fermentação sólida (COLLA *et al.*, 2015). Para o meio sólido, existe uma desvantagem por conter pouca quantidade de água, fazendo com que os microrganismos trabalhem de forma estressante, já em meio líquido, não ocorre esse ponto negativo e tem-se a vantagem de controlar o pH e variar a fonte de carbono (GEOFFRY; ACHUR, 2018).

Lipases fúngicas apresentam melhor produção em pH neutro, podendo variar, dependendo da espécie. Atividades ótimas para fungos lipolíticos em comparação a *Yarrowia lipolítica* e *Cunning hamellaverticillata*, que apresentaram alta atividade de lipases em pH 8,0 e 7,5, em temperatura de 35° C, semelhante à estudada por outros pesquisadores (SADATI; BARGHI; ABBASI LARKI, 2015) com as lipases obtidas de *C. langeronii*, com melhores atividades em pH 6,0 e 9,0. *Aspergillus niger* ou *Aspergillus flavus* são considerados bons produtores de lipases, via fermentação submersa, em diferentes pH, concentração de nitrogênio, indutor e fontes de carbono,

podendo obter valores de 2 U em pH 7,15 (COLLA *et al.*, 2016).

Deve-se compreender que as enzimas que têm grande impacto na economia estão diretamente ligadas a mudanças significativas da sustentabilidade aplicada na indústria. Os processos enzimáticos substituem ou fazem uma complementaridade aos processos químicos, diminuindo o consumo de energia, água e produtos não renováveis, atingindo, assim, impactos positivos no meio ambiente (LANGE; PARMAR; MEYER, 2017). A Embrapa e a Embrapii têm trabalhado tecnologias para biocombustíveis e produtos químicos, utilizando microrganismos e enzimas, despertando o interesse de faculdades para a descoberta de novos meios de prospecção de microrganismos para a produção de biodiesel.

A presença de enzimas em microrganismos como fungos pode abrir portas para obtenção de biodiesel de forma mais rápida a um preço acessível.

Este trabalho desenvolve uma pesquisa baseada em fungos pré selecionados do bagaço de cana-de-açúcar com capacidade lipolítica para reação de transesterificação e produção de biodiesel.

#### Referências bibliográficas

ABD-ALLA, M. H. *et al.* **Improvement of fungal lipids esterification process by bacterial lipase for biodiesel synthesis**. Fuel, Assiut, v. 160, p. 196–204, 15 nov. 2015. doi:10.1016/j.fuel.2015.07.080

AHMAD, T.; DANISH, M.; KALE, P.; GEREMEW, B.; ADELOJU, S. B.; NIZAMI, M.; AYOUB, M. **Optimization of process variables for biodiesel production by transesterification of flaxseed oil and produced biodiesel characterizations**. Renewable Energy, [s. l.], v. 139, p. 1272–1280, 2019.

ANDRADE, T. A.; MARTÍN, M.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. **Biodiesel production catalyzed by liquid and immobilized enzymes: Optimization and economic analysis**. Chemical Engineering Research and Design, [s. l.], v. 141, p. 1–14, 2019.

BRAGA, A. C. **Biotransformação do óleo de rícino em aromas por *Yarrowia lipolytica***. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biológica) - Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2009.

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

COLLA, L. M. *et al.* **Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* through Solid-State and Submerged Fermentation.** BioMed research international, v. 2015, p. 725959, 9 jun. 2015.

COLLA, L. M. *et al.* **Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi.** Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], [s. l.], v. 47, n. 2, p. 461–7, 2016.

COLOGNA, N. de M. *et al.* **Exploring Trichoderma and Aspergillus secretomes: Proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest.** Enzyme and Microbial Technology, [s. l.], v. 109, p. 1–10, 2018.

DANINO, H. *et al.* **PPAR $\gamma$  regulates exocrine pancreas lipase.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, v. 1861, n. 12, p. 1921–1928, 1 dez. 2016.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. **Screening and production of lipase from fungal organisms.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, [s. l.], v. 14, p. 241–253, 2018.

HERMANSYAH, H. *et al.* **Production of Dry Extract Lipase from *Pseudomonas Aeruginosa* by the Submerged Fermentation Method in Palm Oil Mill Effluent.** International Journal of Technology, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 325, 2018.

KAPTUROWSKA, A. U.; STOLARZEWICZ, I. A.; KRZYCZKOWSKA, J.; BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK, E. **Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*.** Ultrasonics Sonochemistry, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 186–191, 2012.

LANGE, L.; PARMAR, V.; MEYER, A. Biocatalysis. **Encyclopedia of Sustainable Technologies**, [s. l.], p. 663–673, 2017. Disponível em:

LORENZETTI, D. L. **Estudos De Aplicação De Lipases Em Formulações Cosméticas.** Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade

Federal do Paraná, 2007.

MARÍN-SUÁREZ, M.; MÉNDEZ-MATEOS, D.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. **Reuse of immobilized lipases in the transesterification of waste fish oil for the production of biodiesel.** *Renewable Energy*, v. 140, p. 1–8, 2019.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger principles of biochemistry:** W.H. Freeman and Company, 2013..

SADATI, R.; BARGHI, A.; ABBASI LARKI, R. Isolation and screening of lipolytic fungi from coastal waters of the southern caspian sea (north of iran). **Jundishapur journal of microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. e16426, 2015.

SAHAY, S.; CHOUHAN, D. **Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation.** *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 16, n. 2, p. 319–325, 2018.

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

SHAH, S. H. Sustainable Biodiesel Production. **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**, [s. l.], 2019.

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

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo geral:

Este trabalho tem por objetivo fazer a prospecção de enzimas lipolíticas em fungos coletados do bagaço de cana-de-açúcar para produzir biodiesel.

### Objetivos específicos:

Crescer os fungos em meio mineral contendo uma única fonte de carbono, avaliar o caldo enzimático com o substrato *p*-NPB por espectrofotometria. Selecionar o melhor fungo através de três análises específicas, sendo elas, teor de proteínas, atividade volumétrica lipolítica e atividade específica lipolítica.

Produzir o caldo enzimático bruto dos melhores fungos, produzir biodiesel a partir desse caldo, fazer a quantificação dos ésteres metílicos em cromatografia gasosa e fazer análise estatística a nível de 5% de significância.

### 3. CAPÍTULO I

(Normas de acordo com a revista em Agronegócio e Meio Ambiente)

#### Avaliação de Atividade Específica Lipolítica em Fungos coletados do Bagaço de Cana-de-açúcar

#### RESUMO

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

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

## ABSTRACT

Lipases are enzymes that are capable of catalyzing chemical reactions, they specifically catalyze lipid bonds. These enzymes can be obtained from lipolytic fungi which by means of a source of carbon can produce high levels of lipases. Fungi that were previously selected from sugarcane bagasse were placed to perform submerged fermentation using extra virgin olive oil as the sole carbon source. The broth produced from these fungi were analyzed by spectrophotometry using *p*-NPB as substrate, the results obtained were analyzed by statistical significance with 5% significance. The present research was able to identify fungi capable of growing in mineral medium with a single lipid carbon source and to quantify lipase specific activities using the *p*-NPB substrate, it was possible to obtain promising values of lipolytic specific activity of three fungi 8,004 U mg<sup>-1</sup>, 5,897 U mg<sup>-1</sup>, 5,077 U mg<sup>-1</sup> for the fungi *Paecilomyces formosus* (first isolate), *Paecilomyces formosus* (second isolate) and *Aspergillus tubingensis*, which are values cited for the first time for these three fungi and compared to other microorganisms in the literature are higher and more active for use in industrial processes.

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

### 3.1 Introdução

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

Um das enzimas de grande importância são as lipases, que são biocatalisadores eficientes em reações de transesterificação ou esterificação (CAROLINE *et al.*, 2013). A necessidade de catalisadores mais acessíveis pode alterar o uso de catalisadores químicos para enzimáticos, facilitando seu uso em reações de transesterificação. Os catalisadores biológicos mostram alta eficiência catalítica, sendo, muitas vezes, superiores aos catalisadores sintéticos e inorgânicos (NELSON; COX; LEHNINGER, 2013). Os biocatalisadores têm vantagens sobre os catalisadores químicos, por terem alta seletividade, catalisando um único tipo de substrato, com características biodegradáveis, diminuindo os impactos ao meio ambiente.

Nesses catalisadores, há enzimas capazes de acelerar reações químicas como hidrólise, esterificação, transesterificação e alcoolização, entre outras. Têm alta especificidade, baixo custo em condições de reação moderada, podendo ser citadas como exemplo as proteases, amilases, lipases e carboidrases (RIOS *et al.*, 2018). O uso da biocatálise nos ambientes industriais envolve benefícios que visam a reduzir o uso de produtos químicos nocivos ao ambiente natural, pois são formulados químicos de alta toxicidade e não apresentam degradabilidade a curto prazo (CAROLINE *et al.*, 2013).

As lipases são enzimas que têm capacidade de catalisar compostos de característica lipídica, sendo que, ao romper estas moléculas por hidrólise, os lipídeos podem ser encontrados sob diferentes formas, como triacilgliceróis, glicerofosfolipídeos, esfingomiéline, esteróis, entre outras. As enzimas podem ser obtidas de diferentes tipos de microorganismos como bactérias, fungos e leveduras, como a lipase oriunda de *Pseudomonas aeruginosa*, que foi fundida com sucesso na superfície de *Pichia pastoris* X33, mostrando eficiência de atividade lipásica em relação à massa seca do microrganismo (RAOUFI, 2018). Pesquisadores utilizaram resíduos

agroindustriais para a produção de enzimas lipolíticas, tendo sido a levedura *Candida guilliermondi* a base de 26 experimentos que relataram que os fatores que envolviam fontes de carbono e nitrogênio, como glicerol, levedura de cerveja e sulfato de amônio, apresentaram maior importância na secreção de enzimas lipase (CAROLINE *et al.*, 2013). O uso desses resíduos proporciona boa opção na produção de metabólitos secundários microbianos, tendo gerado alto valor aos subprodutos agroindustriais.

Para a identificação das atividades lipolíticas em fungos, existe um método de quantificação para lipases em que se emprega o uso de etileno glicol como solvente do butirato de *p*-nitrofenil, estando o substrato presente em meio tampão aquoso, sendo a aferição da atividade de lipase feita com a liberação do *p*-nitrofenol. Trata-se de um método fácil, econômico e de rápido manuseio (FREITAS, 2017). Para esta produção de lipases, os microrganismos podem catalisar diversas fontes de carbono como substrato, ocasionando diferentes propriedades como a fermentação submersa e a sólida, sendo as lipases obtidas por fermentação submersa mais estáveis (COLLA *et al.*, 2015).

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

Nas reações de transesterificação catalisadas por lipases, ocorre formação de subprodutos que influenciam a reação e a atividade lipídica, sendo necessário observar a especificidade da enzima e do substrato a ser catalisado, pois lipases seletivas de determinadas posições podem causar reações intermediárias de transesterificação de baixa significância, resultando em uma percentagem menor de conversão (CANET *et al.*, 2017). Com isso, as lipases são amplamente estudadas para aumentar suas atividades em processos de transesterificação e de estabilidade em solventes orgânicos (KAJIWARA *et al.*, 2017), para o aprimoramento da termoestabilidade através de lipases mutantes (MADAN; MISHRA, 2014) e para a imobilização do catalisador como estratégia para aumentar a eficiência de produtividade em bioprocessos (OLIVEIRA; BASTOS; DE LA TORRE, 2019).

O objetivo deste estudo foi fazer a prospecção de enzimas lipolíticas em fungos coletados de bagaço de cana-de-açúcar por fermentação submersa e avaliar o potencial

em comparação à literatura.

## 3.2 Material e métodos

### 3.2.1 Cultivo e replicação dos fungos

Foi preparado meio BDA (batata, dextrose, ágar), com 10% de ágar e 10% de dextrose, sob agitação e aquecimento suave, sem ebulição. Em seguida, o meio nutritivo e as placas de Petri com 9 cm de diâmetro foram autoclavadas. Em câmara de fluxo laminar, cerca de 17 linhagens fúngicas foram selecionadas e identificadas a partir de amostras de solo do Cerrado. A replicação ocorreu em estufa bacteriológica a 28 °C, durante sete dias.

### 3.2.2 Produção do caldo enzimático

Após a cultura dos fungos, foi preparado meio mineral contendo 7 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 1,5 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 0,15 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O; 0,02 g L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O; 0,06 g L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 0,5 g L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O e extrato de levedura com 0,5 g L<sup>-1</sup> (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2002). Esse procedimento relata os parâmetros ideais para o meio de cultura mineral. O experimento foi feito em triplicata, tendo sido adicionados, para cada fungo, um frasco *Erleynmeyer* contendo 50 mL de meio mineral e 1% de azeite de oliva, sendo este frasco a única fonte de carbono. Os erlenmeyers foram esterilizados em autoclave. Em seguida, em uma câmara de fluxo laminar, os fungos foram inseridos no meio mineral, os frascos foram devidamente tampados e levados para uma mesa agitadora com agitação a 85 rpm por 8 dias sob temperatura ambiente. Após este período, os caldos foram filtrados em papel de filtro qualitativo faixa azul e, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm. O caldo enzimático foi então armazenado sob resfriamento a 4 °C até a quantificação das lipases.

### 3.2.3 Quantificação de lipases

#### 3.2.3.1 Quantificação do teor de proteínas

O procedimento foi feito de acordo com o *Enzymatic of Lipoprotein Lipases* (BRAGA, 2009), com adaptações. No espectrofotômetro UV-vis (Bel, UV-M51), o equipamento foi zerado, utilizando uma cubeta de quartzo de campo único com 1000 µL de água destilada, posteriormente foi feita a leitura do teor de proteínas e acrescentados na cubeta de quartzo 100 µL do caldo enzimático bruto (amostra) mais

900  $\mu\text{L}$  de água destilada. A leitura foi feita em um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 260 e 280 nanômetros (nm).

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

$$\text{Teor de proteínas} = 1,55 * Ab_{280\text{nm}} - 0,76 * Ab_{260\text{nm}} \quad (1)$$

### 3.2.3.2 Quantificação da atividade lipolítica

As leituras foram feitas conforme procedimento anteriormente descrito, tendo sido feitas em 400 nm nos intervalos de tempos entre 0, 5, 15 e 30 minutos. Em uma cubeta de vidro, foram acrescentados 3000  $\mu\text{L}$  de água destilada. Posteriormente, o equipamento foi zerado em 400 nm. Após, em outra cubeta de vidro, foram acrescentados 900  $\mu\text{L}$  de solução tampão de fosfato de sódio 100 mM, com cloreto de sódio 150 mM e 0,5% de triton. Posteriormente, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de caldo enzimático bruto, 10  $\mu\text{L}$  de solução *p*-NPB 50 mM e 2000  $\mu\text{L}$  de solução tampão. Imediatamente, a cubeta foi transferida para o equipamento e foram feitas as leituras nos tempos determinados. Para o branco, foi adotado o mesmo procedimento, porém o caldo enzimático foi levado para o micro-ondas a 900 wats de potência, durante 5 minutos.

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

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

Em que:

1,01 = volume

df = fator de diluição

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

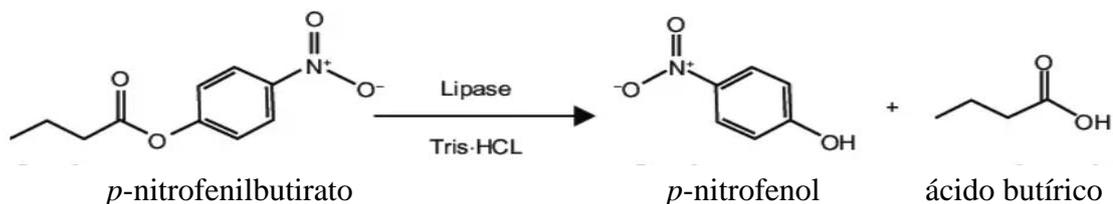
0,1 = volume em mililitros da enzima usada

Para determinação da atividade lipolítica específica em unidade por mg de proteína, foi utilizada a Fórmula (3).

$$\text{Unidade mg de proteína}^{-1} = \frac{\text{Unidade/mL de enzima}}{\text{mg de proteína/mL de enzima}} \quad (3)$$

Na reação entre *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB) na presença de uma solução aquosa e da enzima lipolítica, formam-se o *p*-nitrofenol e o ácido butírico, conforme Figura 1.

**Figura 6** - Representação da reação com *p*-NPB catalisada por lipase



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

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

#### 3.2.4 Análise estatística

Os experimentos foram feitos em triplicata. Os dados estatísticos foram avaliados pela diferença estatística pelo teste de *Tukey* a ( $\leq 0.05$ ). Para a análise estatística, foi utilizado *Software Project for Statistical Computing*, versão (3.5.0 de 2018).

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Fermentação líquida

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

**Figura 7** - *Paecilomyces parvisporus* em desenvolvimento em meio mineral contendo o azeite de oliva como única fonte de carbono.



Fonte: próprio autor

### 3.3.2 Quantificação estatística de lipases

Na Tabela 1 estão apresentados os valores médios dos quantitativos proteicos totais em ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

**Tabela 1** – Valores médios para os teores de proteínas expressos em ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

Teste de homogeneidade de variância

valor-p: 0,0171833

teste de Tukey

Grupos	Tratamentos	Médias
a	<i>Fusarium fujikuroi</i>	2,353 ± 1,15
ab	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,547 ± 0,60
ab	<i>Fusarium proliferatum</i>	1,415 ± 0,47
ab	<i>Aspergillus tubingensis</i>	1,345 ± 0,35
ab	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1,332 ± 0,23
ab	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,296 ± 0,84
ab	<i>Aspergillus flavus</i>	1,111 ± 0,36
b	<i>Paecilomyces formosus</i>	0,911 ± 0,09
b	<i>Aspergillus niger</i>	0,801 ± 0,15
b	<i>Trichoderma harzinaum</i>	0,789 ± 0,24
b	<i>Aspergillus novoparsiticus</i>	0,748 ± 0,65
b	<i>Paecilomyces parvisporus</i>	0,735 ± 0,25
b	<i>Mucor circinelloides</i>	0,620 ± 0,12
b	<i>Fusarium oxysporum</i>	0,501 ± 0,17
b	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,448 ± 0,22
b	<i>Paecilomyces formosus</i>	0,370 ± 0,27
b	<i>Paecilomyces formosus</i>	0,215 ± 0,05

Teste de variância para valor-p, feito através das médias em triplicata. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Conforme a Tabela 1, é possível observar o teor quantitativo de enzimas, em mg mL<sup>-1</sup>, que os fungos foram capazes de produzir, representando a quantidade média total de proteínas existente em um determinado caldo enzimático produzido por cada fungo específico, conforme calculado pela Fórmula (1). O fungo *F. fujikuroi* apresentou diferença estatística pelo teste de *Tukey*, com máxima eficiência no teor proteico. Entretanto, não significa que esta cepa fúngica apresente o maior quantitativo de produção de lipases.

A Tabela 1 mostra a diferença significativa pelo teste de *Tukey* a 5%, podendo ser observado que os valores da concentração de proteínas são separados em dois grupos distintos: grupo a, composto por *F. fujikuroi*, *A. fumigatus*, *F. proliferatum*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. fumigatus*, *A. flavus*; e grupo b, composto por *A. fumigatus*, *F. proliferatum*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *P. formosus*, *A. niger*, *T. harzinaum*, *A. novoparsiticus*, *P. parvisporus*, *M. circinelloides*, *F. oxysporum*, *A. fumigatus*, *P. formosus* e *P. formosus*. Os fungos *Fusarium fujikuroi* e *Aspergillus fumigatus* apresentaram a maior taxa de produção proteica.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores médios de atividade volumétrica lipolítica em U mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 2** – Valores médios para as atividades lipolíticas volumétricas expressas em U mL<sup>-1</sup>.

Teste de homogeneidade de variância		
valor-p: 0,0171833		
teste de <i>Tukey</i>		
Grupos	Tratamentos	Médias
a	<i>A. tubingensis</i>	6,073 ± 2,01
b	<i>P. formosus</i>	3,116 ± 1,10
bc	<i>F. proliferatum</i>	2,070 ± 0,45
bc	<i>P. formosus</i>	1,911 ± 0,95
bc	<i>P. formosus</i>	1,910 ± 0,71
bc	<i>P. parvisporus</i>	1,683 ± 0,41
bc	<i>M. circinelloides</i>	1,342 ± 0,16
bc	<i>A. flavus</i>	1,182 ± 0,24
bc	<i>A. novoparsiticus</i>	1,069 ± 0,32
c	<i>A. niger</i>	0,933 ± 0,79
c	<i>A. brasiliensis</i>	0,796 ± 0,28
c	<i>A. fumigatus</i>	0,705 ± 0,17
c	<i>A. fumigatus</i>	0,682 ± 0,29

Continuação Tabela 2

Grupos	Tratamentos	Médias
c	<i>A. fumigatus</i>	0,659 ± 0,22
c	<i>F. oxysporum</i>	0,637 ± 0,32
c	<i>F. fujikuroi</i>	0,455 ± 0,17
c	<i>T. harzianum</i>	0,273 ± 0,00

Teste de variância para valor-p, feito através das médias em triplicata. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Os resultados da Tabela 2 são calculados conforme Fórmula 2, sendo observada a representatividade em volume da quantidade de lipases presente em um determinado caldo enzimático. Em *A. tubingensis*, pode ser observado o maior resultado da atividade volumétrica lipolítica, com média em U mL<sup>-1</sup>. A Tabela 2 apresenta os resultados em relação aos valores médios de atividade lipolítica específica em U mg<sup>-1</sup>, calculados conforme a Fórmula (3), sendo possível obter qual ou quais fungos produziram o maior quantitativo da atividade de lipase específica. O fungo *P. formosus* apresentou o maior valor de lipase produzida.

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

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados médios para as atividades lipolíticas específicas expressas em U mg<sup>-1</sup>.

**Tabela 3** – Valores médios para atividades lipolíticas específicas expressos em U mg<sup>-1</sup>.

Teste de homogeneidade de variância		
valor-p: 0,001391636		
teste de <i>Tukey</i>		
Grupos	Tratamentos	Médias
a	<i>P. formosus</i>	8,004 ± 1,35
ab	<i>P. formosus</i>	5,897 ± 1,78
abc	<i>A. tubingensis</i>	5,077 ± 3,28
bcd	<i>P. formosus</i>	3,402 ± 1,06
cd	<i>P. parvisporus</i>	2,406 ± 0,68
cd	<i>M. circinelloides</i>	2,191 ± 0,25
cd	<i>A. novoparsiticus</i>	1,903 ± 0,86
cd	<i>A. fumigatus</i>	1,723 ± 0,61
cd	<i>F. proliferatum</i>	1,626 ± 0,86
d	<i>F. oxysporum</i>	1,268 ± 0,60
d	<i>A. flavus</i>	1,171 ± 0,52
d	<i>A. niger</i>	1,092 ± 0,74
d	<i>A. brasiliensis</i>	0,624 ± 0,31
d	<i>A. fumigatus</i>	0,575 ± 0,15
d	<i>A. fumigatus</i>	0,505 ± 0,30
d	<i>T. harzianum</i>	0,369 ± 0,12
d	<i>F. fujikuroi</i>	0,212 ± 0,10

Teste de variância para valor-p, feito através das médias em triplicata. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

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

### 3.4 Discussão

Os fungos necessitam de uma fonte de carbono para seu pleno desenvolvimento e assim produzir seus metabólitos. Esses compostos oriundos do metabolismo podem ser extraídos e aplicados em vários ramos da biotecnologia, como as lipases, que podem ser biossintetizadas e ativadas por estes microorganismos. A observação da cinética durante o crescimento dos fungos em pesquisas demonstra que diferentes fontes de carbono podem ser utilizadas para a produção de lipases, como óleo de soja, glicerol e glicose, tendo sido obtidos resultados com alta eficiência de atividade lipásica (COSTA *et al.*, 2017). O crescimento em várias fontes de carbono demonstra a plena capacidade que os fungos têm de assimilar estes compostos durante seu desenvolvimento, sendo observada nas cepas fúngicas capacidade de assimilarem o azeite de oliva como única fonte de carbono. O azeite mostrou ser uma ótima fonte de carbono para a produção das enzimas lipases, sendo também frequentemente utilizado em diversos estudos em comparação com o óleo de soja como fonte alternativa. Com isso, o azeite de oliva mostra maior eficiência, conseguindo alcançar taxas superiores de produção das enzimas lipases. Esta assimilação com o azeite fez com que os fungos neste estudo produzissem maiores quantitativos proteicos e maiores taxas de enzimas lipases (Tabelas 1, 2 e 3).

Comparando os resultados da Tabela 3 com os da Tabela 4, é possível observar alguns microrganismos produtores de lipases já estudados na literatura, tendo apresentado atividade lipolítica específica, com resultados entre 0,1 a 5,9 U mg<sup>-1</sup>.

**Tabela 4** – Atividades lipolíticas específicas em U mg<sup>-1</sup> presentes na literatura.

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

Quando comparados aos fungos do presente estudo, nota-se que o fungo *Paecilomyces formosus* (primeiro isolado) apresenta atividade lipolítica específica mais

alta quando comparado aos demais microrganismos estudados nessa pesquisa, sendo superior aos microrganismos de referência encontrados na literatura, Tabela 4, com avaliação da taxa de produtividade na atividade específica de lipases usando *p*-NPB como substrato. Os três fungos neste estudo, que apresentaram as mais altas taxas de produtividade na atividade específica de lipases, ainda carecem de estudos, sendo este estudo o primeiro relato de pesquisa sobre a capacidade de produzirem os mais altos níveis de enzima lipase.

Observando os resultados estatísticos, podemos inferir que houve diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ), ou seja, pelo menos um dos fungos apresenta diferença um do outro. A Tabela 1 mostra a quantidade geral de enzimas presentes no meio, e esse resultado, em sua maioria, é inversamente proporcional aos resultados em quantidades de lipases presentes no meio, ou seja, existem vários tipos de proteínas que um microorganismo pode produzir, mas existem enzimas que são mais ativas em certos substratos. As lipases apresentam alta especificidade, podendo ser seletivas a determinadas posições em relação ao substrato que catalisará. Estas enzimas podem produzir algumas dessas reações insignificantes, resultando em menor percentagem de conversão (KAPTUROWSKA *et al.*, 2012). Para que as lipases produzidas a partir de linhagens fúngicas se tornem mais específicas, elas precisam conseguir catalisar o substrato *p*-NPB, que tem menor cadeia de carbonos e, assim, conseguir obter maiores valores de atividades lipolíticas específicas.

Os fungos com maiores atividades específicas de lipases foram *P. formosus* I e II e *A. tubingensis*, que não apresentaram diferenças significativas entre si. O fungo *P. formosus* é um fungo da classe endofítica, pertencente à família Eurotiaceae, filo Ascomiceto, que pode ser encontrado no bagaço da cana-de-açúcar. Este fungo foi relatado pela primeira vez no Brasil em 2016 (ANDREZA *et al.*, 2016), sendo, assim, um fungo pouco estudado, que pode apresentar grande importância em processos bioindustriais, principalmente no estudo enzimático. O fungo *Aspergillus tubingensis* apresentou também boa eficiência neste estudo, com resultados superiores em relação aos microrganismos descritos na Tabela 4, sendo apenas inferior ao fungo *Candida rugosa*, mas com resultados similares, mostrando que as atividades lipolíticas são altas e também promissoras para várias aplicações industriais.

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

### 3.5 Conclusão

Conclui-se que os fungos em estudo foram capazes de se desenvolver e produzir lipases, utilizando azeite de oliva como única fonte de carbono. Em especial o fungo *P. formosus* I (primeiro isolado), que conseguiu produzir  $8,004 \text{ U mg}^{-1}$  de lipases, seguido dos pelos fungos *P. formosus* II (segundo isolado) e *A. tubingensis*. Segundo a literatura, esses resultados são considerados elevados e com capacidade de serem utilizados na bioindústria, sendo também o primeiro relato científico destas enzimas lipolíticas produzidos por estes fungos.

### 3.6 Referências Bibliográficas

- ATALAH, J. *et al.* Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. **Bioresource Technology**, v. 280, p. 478–488, 2019.
- BRAGA, Adelaide Correia. **Biotransformação do óleo de rícino em aromas por *Yarrowia lipolytica***. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biológica) - Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2009.
- CANET, A. *et al.* **Exploring substrate specificities of a recombinant *Rhizopus oryzae* lipase in biodiesel synthesis**. *New Biotechnology*, Barcelona, v. 39, p. 59–67, 25 out. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.003>
- COLLA, L. M. *et al.* **Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* through Solid-State and Submerged Fermentation**. *BioMed research international*, v. 2015, p. 725959, 9 jun. 2015.
- COSTA, T. M. *et al.* **Lipase Production By *Aspergillus Niger* Grown In Different Agro-Industrial Wastes By Solid-State Fermentation**. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 34, n. 2, p. 419–427, abr. 2017.

- DANINO, H. *et al.* **PPAR $\gamma$  regulates exocrine pancreas lipase.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1861, n. 12, p. 1921–1928, 1 dez. 2016.
- FREITAS, M. F. M. **Produção De Lipases Por Leveduras Isoladas Do Bagaço De Caju Utilizando Fontes Alternativas De Carbono E Nitrogênio.** 2017. 104 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2017.
- GARCIA, A. K. **Avaliação da atividade lipolítica de fungos filamentosos da costa brasileira.** 2011. 56 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.
- KAJIWARA, S. *et al.* **Development of sucrose-complexed lipase to improve its transesterification activity and stability in organic solvents.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 121, p. 83–87, 2017.
- KAPTUROWSKA, A. U. *et al.* **Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 19, n. 1, p. 186–191, 1 jan. 2012.
- KHAN, S. *et al.* **Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*.** *Environmental Pollution*, v. 225, p. 469–480, 1 jun. 2017.
- LOPES, L. V. *et al.* **Primeiro relato da ocorrência de *Paecilomyces formosus* e *Paecilomyces parvisporus* no Brasil.** *R. bras. Bioci.*, Porto Alegre, v. 14, n.4, p. 215-224, out./dez. 2016
- LORENZETTI, D. L. **Estudos De Aplicação De Lipases Em Formulações Cosméticas.** Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, 2007.
- MADAN, B; MISHRA, P. **Directed evolution of *Bacillus licheniformis* lipase for improvement of thermostability.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 91, p. 276–282, 15 out. 2014.
- NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger principles of biochemistry.** [S.l.]: W.H. Freeman and Company, 2013.
- OLIVEIRA, A. F.; BASTOS, R. G.; DE LA TORRE, L. G. ***Bacillus subtilis* immobilization in alginate microfluidic-based microparticles aiming to improve lipase productivity.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 143, p. 110–120, 15 mar.

2019.

OLIVEIRA, A. *et al.* **Utilização De Resíduos Da Agroindústria Para A Produção De Enzimas Lipolíticas Por Fermentação Submersa.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, n. 1, p. 19–26, 2013.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. **Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture.** Bioresource Technology, v. 82, n. 1, p. 43–49, 1 mar. 2002.

PRAJAPATI, B. P. *et al.* **Characterization of cellulase from *Aspergillus tubingensis* NKBP-55 for generation of fermentable sugars from agricultural residues.** Bioresource Technology, v. 250, p. 733–740, 1 fev. 2018.

RAOUFI, Z.; MOUSAVI G.; SEYED L. **Biodiesel production from microalgae oil by lipase from *Pseudomonas aeruginosa* displayed on yeast cell surface.** Biochemical Engineering Journal, v. 140, p. 1–8, 15 dez. 2018.

RIOS, N. S. *et al.* **Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications.** Process Biochemistry, v. 75, p. 99–120, 2018.

SAHAY, S.; CHOUHAN, D. **Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation.** Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, v. 16, n. 2, p. 319–325, 2018.

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

## 4. CAPÍTULO II

(Normas de acordo com a Revista Brasileira de Ciências Ambientais)

### Produção de ésteres metílicos a partir de lipases de fungos lipolíticos

#### RESUMO

Biodiesel é um combustível renovável, pois é proveniente de matéria prima vegetal ou animal, nos últimos anos tem ganhado destaque como um possível substituto dos combustíveis fósseis, principalmente o diesel. Ele é obtido por meio de transesterificação ou esterificação, onde as lipases que são sintetizadas através de fungos lipolíticos podem ser usadas como catalisadores. A presente pesquisa teve por objetivo realizar a prospecção de enzimas lipolíticas em fungos e utilizar o caldo enzimático bruto para produzir biodiesel. O crescimento dos fungos foi realizado em meio mineral contendo uma única fonte de carbono, o azeite de oliva extra-virgem, o caldo bruto foi analisado por espectrofotometria, utilizando o *p*-NPB como substrato para quantificar as lipases. O caldo bruto produzido foi utilizado sem nenhuma modificação na presença de diferentes proporções de um planejamento central composto, de óleo e metanol para a produção de ésteres metílicos que foram analisados em cromatografia gasosa. Os fungos *Paecilomyces formosus* (Sakag. & Tada & Samson) I, *Paecilomyces formosus* II e *Aspergillus tubingensis* Mos., produziram uma atividade lipolítica específica de 9,268 U g<sup>-1</sup>, 7,032 U g<sup>-1</sup> e 6,447 U g<sup>-1</sup>, respectivamente, e a partir do caldo bruto usado diretamente para a produção de biodiesel, foi possível alcançar valores de 41,60% de ésteres metílicos, concluindo que as lipases desses fungos são ativas e que quando aplicadas diretamente através do caldo bruto é possível realizar a transesterificação obtendo valores promissores até maiores que alguns encontrados na literatura, sendo uma lipase de grande potencial industrial.

Palavras-chave: Energia renovável; fermentação submersa; *Paecilomyces formosus*; enzimas.

## **Production of methyl esters from lipolytic fungal lipases**

### **ABSTRACT**

Biodiesel is a renewable fuel, as it comes from vegetable or animal raw materials, in recent years it has gained prominence as a possible substitute for fossil fuels, especially diesel. It is obtained by transesterification or esterification, where lipases that are synthesized through lipolytic fungi can be used as catalysts. This research aimed to prospect lipolytic enzymes in fungi and use crude enzyme broth to produce biodiesel. The growth of the fungi was performed in mineral medium containing a single carbon source, extra virgin olive oil, the broth was analyzed by spectrophotometry, using p-NPB as substrate to quantify lipases. The crude broth produced was used without any modification in the presence of different proportions of a composite central design of oil and methanol for the production of methyl esters which were analyzed by gas chromatography. The fungi *Paecilomyces formosus* (Sakag. & Tada & Samson) I, *Paecilomyces formosus* II and *Aspergillus tubingensis* Mos. Produced a specific lipolytic activity of 9,268 U g<sup>-1</sup>, 7,032 U g<sup>-1</sup> and 6,447 U g<sup>-1</sup>, respectively, and From the broth used directly for biodiesel production, it was possible to reach values of 41.60% of methyl esters, concluding that the lipases of these fungi are active and that when applied directly through the broth it is possible to perform transesterification obtaining values. promising even higher than some found in the literature, being a lipase of great industrial potential.

**Keywords:** Renewable energy; submerged fermentation; *Paecilomyces formosus*; enzymes.

#### 4.1 Introdução

Fungos são um grupo de espécies microbianas com capacidade de desempenhar funções metabólicas e fisiológicas (MOJZITA; RANTASALO; JÄNTTI, 2019). Esses microrganismos podem produzir diversas enzimas, como amilase, protease, pectinase, celulase e lipase, que podem ser sintetizadas por *Aspergillus niger* Tiegh. e *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn., *Aspergillus niger* e *Aspergillus clavatus* Desm., *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma viride* Pers., *Penicillium* sp, respectivamente (WÖSTEN, 2019). As diferentes enzimas produzidas por fungos filamentosos podem ser aplicadas em várias áreas, como na fabricação de xarope de glicose, amaciantes, alimentos, reações de transesterificação, sendo catalisados por amilase, celulase, protease e lipase, respectivamente (WÖSTEN, 2019).

A síntese de lipases por microrganismos está relacionada à eficácia de os fungos acumularem lipídeos. (SZCZEŚNA-ANTCZAK *et al.*, 2018) estudaram o fungo *Mucor circinelloides* Tiegh e, pelo aumento da sua capacidade de acumular óleo em relação ao seu peso seco, otimizaram o acúmulo de lipídeos com lipases intracelulares, assim conseguindo obter mais de 60% de lipídeos. As condições do meio de cultura também influenciam na produção de enzimas. Bancercz *et al.* (2016) mostraram isso com a utilização do fungo *Rhizomucor variabilis* (Zheng & Chen). Os autores variaram as temperaturas entre 4 e 25 °C, utilizando algumas fontes de carbono, podendo ser destacadas a maltose, que obteve 4 U mL<sup>-1</sup> de atividade volumétrica lipolítica, e a glicose, com uma atividade de 22,45 U mL<sup>-1</sup>.

Para verificação de presença de lipases em fungos filamentosos, sua quantificação pode ser feita utilizando substratos como laurato de *p*-nitrofenil (*p*-NPL), butirato de *p*-nitrofenil (*p*-NPB) (Braga, 2009), ou palmitato de *p*-nitrofenil (*p*-NPP) (Lopes, Fraga & Fleuri, 2011), que são um dos métodos mais conhecidos. Braga (2009) demonstrou por meio de análises estatísticas que um método de precisão é o que utiliza *p*-NPB.

Por consequência, essas lipases produzidas por esses microrganismos podem ser utilizadas na produção de biodiesel, que é uma mistura de monoalquílicos de ácidos graxos, sendo um combustível sustentável, proveniente de matérias-primas renováveis,

oriundas de álcoois e triacilgliceróis, geralmente produzido por uma reação de catálise alcalina, ou seja, transesterificação (CANET *et al.*, 2017).

Algumas lipases de bactérias também já foram estudadas para utilização em síntese de biodiesel, como *Bacillus firmus* Rab, que, segundo Abd-Alla, Bagy, Morsy & Hassan (2015), apresentou estabilidade em solventes orgânicos, e suas enzimas se mostraram eficientes e de alto rendimento para a transesterificação. Estudos envolvendo fungos lipolíticos utilizando o próprio caldo bruto ainda são escassos, sendo que essa alternativa pode gerar aumento da sustentabilidade na síntese de biodiesel.

Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo fazer a prospecção de enzimas lipolíticas em fungos e utilizar o caldo enzimático bruto para produzir biodiesel.

## 4.2 Material e métodos

### 4.2.1 Produção do caldo bruto enzimático

Foi feito o crescimento dos fungos *Paecilomyces formosus* (isolado I), *Paecilomyces formosus* (isolado II) e *Aspergillus tubingensis* (isolado III) em meio contendo BDA (batata, dextrose e ágar), tendo sido colocados em estufa (Bunker, NI 1525) a 28 °C, durante 7 dias. Após, foi preparado um meio mineral, segundo Papanikolaou e Aggelis (2002), contendo 7 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 1,5 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 0,15 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O; 0,02 g L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O; 0,06 g L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 0,5 g L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O; e extrato de levedura com 0,5 g L<sup>-1</sup>. Todo o procedimento foi feito em triplicata, utilizando como única fonte de carbono azeite de oliva a 1%. Os fungos foram cultivados em erlenmeyers contendo 100 mL de meio mineral e a fonte de carbono, em seguida, os frascos foram levados a uma mesa agitadora orbital (Solab, SL-180A) durante 8 dias, sob agitação de 90 rpm em temperatura ambiente. Os caldos enzimáticos foram filtrados para separar a parte microbiológica e centrifugados (centrífuga Solab, SL-705) durante 10 minutos a 4000 rpm para a separação de todos os particulados presentes no meio. O caldo bruto enzimático foi mantido sob resfriamento a 4° C em geladeira.

### 4.2.2 Quantificação de atividade lipolítica

A atividade lipolítica, o teor de proteínas e a atividade específica de lipases do

caldo enzimático foram avaliados por método colorimétrico, conforme Braga (2009), baseado no procedimento *Enzymatic Assay of Lipoprotein lipase (EC 3.1.134)* modificado.

#### 4.2.3 Teor de proteínas

Para teor de proteínas, foi feita uma primeira leitura em um espectrofotômetro UV-vis (Bel, UV-M51) ( $\lambda$ ) 260 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de campo único e água destilada para zerar o equipamento. Em seguida, a amostra (caldo enzimático bruto) foi diluída 10 vezes em água destilada, feita a leitura, mudado o  $\lambda$  para 280 nm e adotado o mesmo procedimento, anotando os valores obtidos.

Para o cálculo de teor de proteínas em mg de proteína por mL de enzima, foi utilizada a Equação 1.

$$\text{Teor de proteínas} = 1,55 * Ab_{280nm} - 0,76 * Ab_{260nm} \quad (1)$$

#### 4.2.4 Atividade volumétrica lipolítica e atividade específica de lipase

A atividade volumétrica lipolítica foi determinada utilizando uma solução tampão de fosfato de sódio 100 mM, com cloreto de sódio 150 mM e 0,5% (v/v) de triton, em pH 7,2, em temperatura ambiente, identificado como solução A, utilizando a solução A como solvente. Em seguida, foi preparada uma solução de *p*-NPB 50 mM, identificada como solução B, que é o substrato para a lipase. Na sequência, tomou-se uma cubeta de vidro e se acrescentou água destilada e no espectrofotômetro em um  $\lambda$  de 400 nm zerou-se o equipamento. As determinações foram feitas nos tempos de 0, 5, 15 e 30 minutos. Em outra cubeta de vidro, foram acrescentados, com uma pipeta volumétrica, 900  $\mu$ L da solução A, 100  $\mu$ L do caldo enzimático, 10  $\mu$ L da solução B e mais 2000  $\mu$ L da solução A. A mistura foi homogeneizada, feita a leitura nos tempos determinados e anotados os valores obtidos. A modificação do procedimento descrito na literatura ocorreu na realização do branco feito da seguinte forma: para o branco, foi feito o mesmo procedimento, porém o caldo enzimático foi levado ao micro-ondas a 900 wats de potência durante 5 minutos para a inativação das enzimas. Para o cálculo da atividade volumétrica lipolítica, foi utilizada Equação 2.

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

Em que a 1,01 é o volume adicionado na cubeta, df é o fator de diluição, 0,0148 é o coeficiente de extinção Micromolar de *p*-nitrofenila a 400 nm e 0,1 é o volume em mililitros da enzima utilizada

Para obtenção da atividade específica de lipase, foi feito um cálculo dado pela divisão da atividade volumétrica lipolítica pelo do teor de proteínas em unidade por mg de proteína, representada pela Equação 3:

$$\text{Unidade mg de proteína}^{-1} = \frac{\text{Unidade/mL de enzima}}{\text{mg de proteína/mL de enzima}} \quad (3)$$

Na reação entre o butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB), ocorre a hidrólise do substrato feita pela enzima, formando um cromóforo, produto corado, que pode ser quantificado pela absorbância em um determinado comprimento de onda, que depende do substrato a ser utilizado (Braga, 2009).

#### 4.2.5 Produção de biodiesel

A transesterificação foi feita com 45g de óleo de soja comercial, que reagiu com metanol e o catalisador, o caldo enzimático bruto produzido pelos fungos, com parâmetros estabelecidos na Tabela 1. Esses reagentes foram colocados em erlenmeyers em uma mesa agitadora orbital (Solab, SL-180A), com agitação a 100 rpm a temperatura ambiente, durante 24 horas. Efeitos de fatores-chave na produção de biodiesel foram estudados com diferentes proporções molares de óleo:metanol e variação enzimática.

**Tabela 1** - Valores de delineamento experimental fatorial

Variáveis independentes	Faixas e níveis				
	-2	-1	0	1	2
Razão molar (óleo:álcool)	1:1,55	1:3	1:6,5	1:10	1:11,45
Quantidade de enzima (% v/v)	0,34	2	6	10	11,66

#### 4.2.6 Análise de ésteres e estudo estatístico

O produto formado foi avaliado em cromatógrafo gasoso com detector com ionização por chama, de acordo com a norma europeia (EN) 14103, utilizando uma coluna de polietileno glicol 30m x 0.25 – 0.32 x 0.25, com o padrão interno C19, feito no Instituto Federal de São Paulo, Campus – Matão. Em seguida, foram feitas análises estatísticas (ANOVA) e o teste de *Tukey* a ( $\leq 0.05$ ). Os dados foram avaliados pelo *Software Project for Statistical Computing*, versão (3.5.0 de 2018). Na sequência, foi feita análise estatística de gráfico de pareto, do gráfico de probabilidade normal e do gráfico de contorno, pelo programa minitab.

#### 4.3 Resultados e discussão

As três estirpes de fungos cresceram no meio mineral e foram capazes de produzir caldo enzimático, utilizando como única fonte de carbono azeite de oliva extra virgem. A Tabela 2 mostra a quantificação da atividade lipolítica para cada fungo, o teor de proteínas (T.P.), a atividade volumétrica (A.V.) e a atividade específica de lipases (A.E.).

**Tabela 2 -** Quantificação da atividade lipolítica

<b>Fungos</b>	<b>*T. P. (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>A. V. (U mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>A. E. (U mg<sup>-1</sup>)</b>
<i>Paecilomyces formosus I</i>	0,707	6,551	9,268
<i>Paecilomyces formosus II</i>	0,728	5,118	7,032
<i>Aspergillus tubingensis III</i>	0,572	3,685	6,447

\*T.P.: Teor de proteínas; A.V. Atividade volumétrica; A.E. Atividade específica de lipases

O fungo com maior produção de lipases ativas foi o *P. formosus I*, com 9,268 U mg<sup>-1</sup>, seguido pelos fungos *P. formosus II* e *A. tubingensis*. O valor de A.E. é de interesse da pesquisa, pois representa a capacidade enzimática de lipases que estão presentes no meio, sendo essas lipases que vão reagir como catalisadores. Para os fungos *P. formosus* e *A. niger*, não foram encontrados resultados na literatura para a A.E. utilizando como fonte de carbono azeite de oliva para produzir lipases e para sua quantificação utilizando *p*-NPB, sendo o primeiro relato apresentado nesse estudo.

A análise utilizando *p*-NPB é um procedimento um pouco mais caro, porém é um método mais preciso como apresentado por Braga (2009), que, por meio desse substrato, quantificou lipases do fungo *Candida rugosa* (HW Anderson) Diddens & Lodder. Em comparações comerciais (CALB, lipozyme TL IM e lipolase 100T), a

lipase da *C. rugosa* apresentou uma atividade específica de  $5,9 \text{ U mg}^{-1}$ , a lipozyme TL IM e lipolase 100T  $0,23 \text{ U mg}^{-1}$  e a lipase CALB  $0,135 \text{ U mg}^{-1}$ , mostrando que o presente estudo conseguiu valores mais altos, Tabela 2, do que as lipases comerciais.

A afinidade da lipase em relação ao substrato também influencia na atividade específica, pois ela reage com os resíduos de aminoácidos no sítio catalítico, conseguindo catalisar ésteres de cadeias mais curtas ou mais longas. Freitas (2017) demonstrou isso ao quantificar lipases de *Candida tropicalis* (Castell, Berkhout), cujo substrato *p*-NPB não apresentou A.V. Ao utilizar o substrato laurato de *p*-nitrofenil (*p*-NFL), conseguiu-se obter  $0,328 \text{ U mL}^{-1}$  de atividade volumétrica de lipases e, ao utilizar o *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NFP), obteve  $0,065 \text{ U mL}^{-1}$ .

A fonte de carbono para a produção de lipases também influencia na atividade específica Silva (2005) desenvolveu um estudo com o fungo *Metarhizium anisopliae* com Ilya, utilizando diferentes fontes de carbono, incluindo azeite de oliva (1%) misturado com glicose a (1%). Em um período de 48 horas, conseguiu produzir  $1,8 \text{ U mg}^{-1}$  de A.E. e, em um período de 96 horas, o valor aumentou para  $6,2 \text{ U mg}^{-1}$ , seguido da proporção de 0,2% de glicose com 1% de azeite de oliva, obtendo  $6,7 \text{ U mg}^{-1}$  de A.E., utilizando o *p*-NPB como substrato.

O fungo com produção de 41,60% de teor de éster foi o *P. formosus* II, nas condições de Razão Molar Óleo:Metanol (ROM) 1:6,5 e quantidade de enzima de 11,66% (v/v) de caldo enzimático bruto adicionado. Esta condição permitiu uma conversão de 41,60%, observando que sua lipase consegue catalisar o substrato, sendo o resistente ao metanol presente e também a estirpe com a segunda maior produção de A.E.,  $7,032 \text{ U mg}^{-1}$ . Poucos estudos mostram a utilização do caldo enzimático bruto produzido por fungos lipolíticos na síntese de biodiesel, sendo, contudo, um método mais barato, não havendo necessidade de isolar a enzima, porém a grande quantidade de água pode interferir no produto final, sendo necessárias otimizações para uma maior produção de biodiesel.

Uma pesquisa apresentada por Ferraz, (2014) faz uma comparação da levedura *Sporidiobolus pararoseus* (Fell & Tallman) na esterificação a partir do extrato enzimático bruto, extrato enzimático precipitado, extrato enzimático bruto imobilizado e extrato enzimático precipitado imobilizado, obtendo 27,24%, 24,87%, 42,31% e 24,69% de ésteres, respectivamente, valores próximos aos obtidos no presente estudo, tanto do

extrato bruto quanto o imobilizado. *P. formosus* II apresentou o maior valor de conversão, 41,60%, maior que o valor bruto apresentado por Ferraz (2014), mostrando que os resultados encontrados nessa pesquisa são promissores.

Foi feito um estudo estatístico em que foram analisados três fatores para obter as relações que apresentam diferenças estatísticas entre em si: fator 1, fungo; fator 2, ROM; e fator 3, enzima (%). A Tabela 3 apresenta a análise de variância (ANOVA).

**Tabela 3** - Análise de variância da interação dos três fatores na produção de teores médios de ésteres.

	<b>*GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
<b>Fungo</b>	2	72,96	36,48	8,3149	7,00E-04
<b>ROM</b>	4	21,19247	5,29812	1,2076	0,3176
<b>Enzima</b>	4	160,49188	40,123	9,1453	0
<b>Fungo*ROM</b>	8	212,11458	26,5143	6,0435	0
<b>Fungo*Enzima</b>	8	502,04125	62,7552	14,3039	0
<b>Rom*Enzima</b>	16	44,55375	2,78461	0,6347	0,8421
<b>Fungo*ROM*Enzima</b>	32	8,9725	0,28039	0,0639	1
<b>Resíduo</b>	57	250,075	4,38728		
<b>Total</b>	131	1272,4014			

Teste f (ANOVA) \*GL: graus de liberdade entre e dentro dos grupos; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio dentro e entre os grupos; Fc: variância entre os grupos, dividida pela variância dentro dos grupos; Pr>Fc: análise do F calculado em comparação com o F tabelado. ROM: razão molar óleo:metanol.

Os dados da Tabela 3 mostram diferença entre os fungos e diferença entre os tratamentos das enzimas ao observar que o p-valor é menor do que 5%. Para saber qual deles é diferente, foi necessário fazer uma comparação entre pares, tendo sido utilizado o teste de *Tukey*. Analisando o ROM apenas sem interação, nota-se que não foi estatisticamente diferente, pois o p-valor é maior que 5%, mostrando que não há evidência significativa para rejeitar a hipótese nula de homogeneidade. O coeficiente de variação foi de 9,77%, mostrando que os dados têm baixa dispersão e são homogêneos.

Analisando as taxas médias de transesterificação, pode-se observar que, a nível de 5% de confiança, houve diferença significativa quando comparados os fungos dentro de cada nível, os níveis de ROM 1:6,5, 1:10 e 1:11,45 e os níveis de percentagem enzimática 0,34%, 2% e 11,66%, que podem ser observados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Teste de *Tukey* dos desdobramentos dos fungos dentro dos níveis ROM e percentagem enzimática (Enz%).

<b>Teste de Tukey</b>			
<b>Níveis (ROM)</b>	<b>Grupos</b>	<b>Tratamentos</b>	<b>Médias</b>
1:6,5	a	<i>P. formosus</i> II	27,57 ± 2,77
	b	<i>A. tubingensis</i>	24,97 ± 2,68
	b	<i>P. formosus</i> I	23,76 ± 2,29
1:10	a	<i>P. formosus</i> I	26,52 ± 0,85
	a	<i>P. formosus</i> II	25,37 ± 1,48
	b	<i>A. tubingensis</i>	20,45 ± 1,62
1:11,45	a	<i>A. tubingensis</i>	27,55 ± 0,21
	ab	<i>P. formosus</i> I	24,40 ± 0,14
	b	<i>P. formosus</i> II	22,15 ± 1,63
<b>Níveis (enz%)</b>			
0,34%	a	<i>A. tubingensis</i>	28,30 ± 0,14
	ab	<i>P. formosus</i> II	25,70 ± 0,99
	b	<i>P. formosus</i> I	21,85 ± 0,78
2%	a	<i>P. formosus</i> I	28,22 ± 0,85
	a	<i>P. formosus</i> II	27,95 ± 1,49
	b	<i>A. tubingensis</i>	18,77 ± 1,62
11,66%	a	<i>P. formosus</i> II	41,60 ± 2,83
	b	<i>A. tubingensis</i>	24,55 ± 2,40
	b	<i>P. formosus</i> I	24,45 ± 1,06

Teste de variância para valor-p, feito através das médias em triplicata. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de *Tukey* a 5%. ROM: razão molar óleo:metanol; enz%: percentagem enzimática.

Pode-se observar que, para ROM 1:6,5, Tabela 4, as lipases do fungo *P. formosus* II apresentam o maior valor médio de teor de ésteres, estando presente no grupo **a**, estatisticamente diferente a nível de 5% de significância das lipases dos outros dois fungos, que estão no grupo **b**, sendo que eles não diferem entre si. Já com uma razão molar 1:10 óleo:metanol, as lipases do fungo *P. formosus* I apresentam o maior teor de ésteres, seguidas das lipases do fungo *P. formosus* II, ambas presentes no grupo **a**, ou seja, elas não são estatisticamente diferentes, mas apresentam uma diferença com as lipases do fungo *A. tubingensis*, presente no grupo **b**, e têm a menor média. No nível 1:11,45, as lipases do fungo com maior média foram aquelas provenientes do fungo *A. tubingensis*, do grupo **a**, junto com o fungo *P. formosus* I, mostrando que não há diferença significativa entre eles. No grupo **b**, estão os fungos *P. formosus* I e II, que não diferem entre si, além disso pode-se perceber que, à medida que se aumenta a

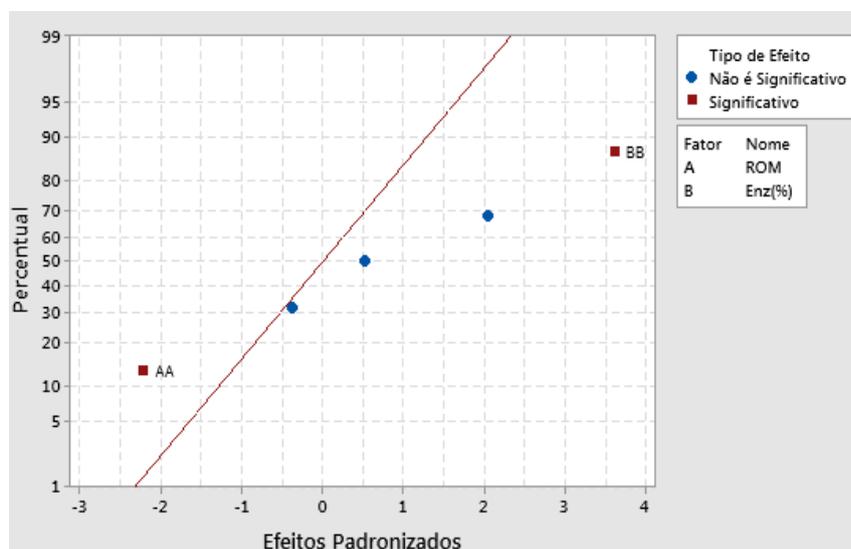
ROM, a produção de ésteres pelas lipases do fungo *P. formosus* II diminui, e isso pode ocorrer pelo fato de que as lipases podem ter sido em parte desativadas pelo aumento do metanol presente no meio. Para os demais níveis, 1:1,55 e 1:3 dos fungos dentro da ROM, não houve diferença estatística entre eles.

As lipases desses microrganismos dentro do nível de 0,34% de enzima, Tabela 4, podem ser separadas em dois grupos. As lipases do fungo *A. tubingensis* conseguiram produzir o maior valor médio de teor de ésteres e estão no grupo **a**, junto com o fungo *P. formosus* II, que não apresentou diferenças estatísticas. No grupo **b**, estão o fungo *P. formosus* II e I, que não diferem estatisticamente entre si, porém o *P. formosus* I apresenta diferença em relação ao fungo *A. tubingensis*. No nível de 2% de enzima, o fungo *P. formosus* I, a partir de suas lipases, conseguiu obter o maior valor de teor de ésteres e está dentro do grupo **a**, junto com o fungo *P. formosus* II, não apresentando diferença significativa entre si, seguido do fungo *A. tubingensis*, que está no grupo **b**, com menor conversão.

O nível de 11,66% de enzima é a relação em que se obteve o maior teor de ésteres metílicos. As lipases do fungo *P. formosus* II estão no grupo **a**, sendo ele estatisticamente diferente dos demais fungos. As lipases desse fungo conseguiram catalisar o substrato em 41,60%, mostrando que as lipases desse fungo são mais específicas para esse substrato do que os outros dois fungos, visto que as lipases são bastante específicas em relação a ligações que catalisam (CANET *et al.*, 2017). No grupo **b**, estão os fungos *A. tubingensis* e *P. formosus* I, que não diferem estatisticamente entre si. Nesse caso também podemos observar que, para as lipases do fungo *P. formosus* II, à medida que se aumenta a concentração de enzima, o teor de ésteres também aumenta. Para os níveis 6% e 10% de enzima, não houve diferença estatística entre os fungos.

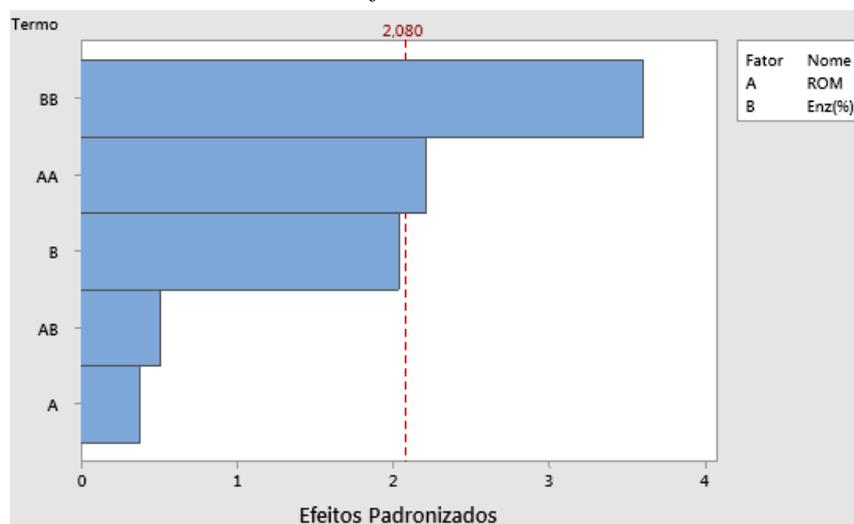
Analisando então o fungo *P. formosus* II, que apresentou tendência ao aumentar o ROM ou a Enz(%), são apresentados a curva de distribuição de probabilidade normalizada para os efeitos padronizados, Figura 1, e o gráfico de pareto, que analisa em qual ponto os efeitos são estatisticamente significativos (Figura 2).

**Figura 15** - Gráfico normal dos efeitos padronizados ( $p=5\%$ ), a linha vermelha divide os efeitos negativos dos positivos.



\*ROM: razão molar óleo:metanol; Enz (%), percentagem enzimática.

**Figura 2** - Gráfico de pareto para os efeitos padronizados ( $p=5\%$ ) das lipases do fungo *P. formosus* II

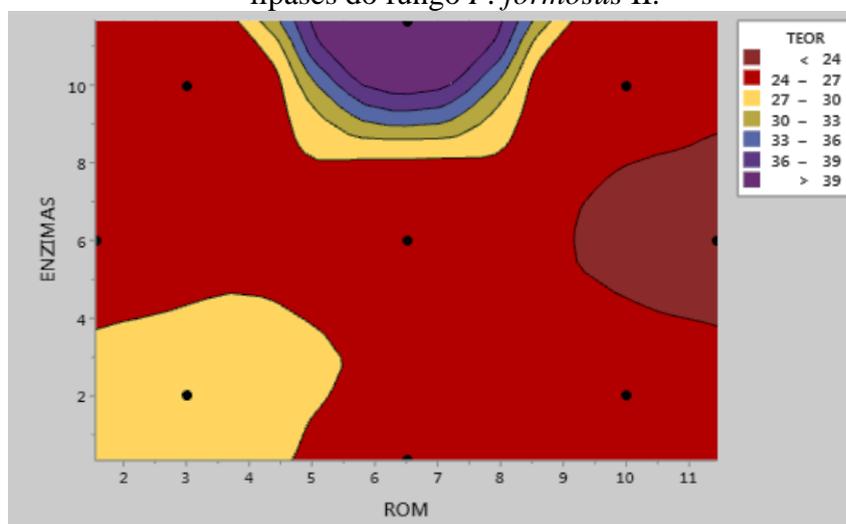


\*ROM: razão molar óleo:metanol; Enz (%), percentagem enzimática.

Todos os fatores e interações que são representados por um quadrado vermelho, Figura 1, foram significativos e se localizam afastados da linha central vermelha. Os efeitos posicionados próximos à linha foram representados por um círculo azul e correspondem à estimativa dos erros, não sendo significativos. Na Figura 2, todos os efeitos que apresentam valores maiores que 2,08, os quais se localizam à direita da linha tracejada, foram significativos. Observando as duas figuras, pode-se inferir que o

valor quadrático da enzima foi a variável mais importante no processo de obtenção de teor de ésteres pelas lipases do fungo *P. formosus* II, e o valor positivo do seu coeficiente significou que a produção de ésteres metílicos foi favorecida por valores de 11,66% de enzima. O segundo fator importante foi a relação quadrática da ROM, que mostra que valores menores dessa interação, 1:6,5, conduzem a um valor maior de teor de ésteres. Essa interação entre percentagem de enzima e ROM pode ser observada na Figura 3 pelo gráfico de contorno, que, na parte mais arroxeadada, mostra as maiores conversões e, na parte mais vermelha, as menores.

**Figura 3** – Gráfico de contorno da interação percentagem enzimática e ROM das lipases do fungo *P. formosus* II.



\*Enzimas: em percentagem enzimática; ROM: razão molar óleo:metanol; Teor: teor de ésteres em percentagem (%).

A figura 3 mostra que o ponto 1:6,5 de ROM e 11,66% de enzimas é o maior ponto de conversão e que, à medida que a relação entre os dois fatores se torna mais central para o ROM e mais alto para a percentagem enzimática, a conversão será maior, e quanto maior a ROM, menor será a conversão em ésteres metílicos.

As análises estatísticas mostram que os ésteres metílicos produzidos a partir de lipases fúngicas podem se modificar em relação a concentrações de enzimas e metanol que se acrescenta ao meio. Trata-se de um estudo promissor, e o fungo *P. formosus* II pode ser estudado em diferentes temperaturas para obter maiores teores de ésteres, visto que uma reação de biodiesel ocorre em faixas de 40° C a 60° C, e no presente estudo já se obteve uma boa conversão utilizando o caldo bruto em temperatura ambiente, podendo, assim, ocorrer um aumento significativo se a temperatura for modificada.

#### 4.4 Conclusão

As três estirpes de fungos *Paecilomyces formosus* I, *Paecilomyces formosus* II e *Aspergillus tubingensi* apresentam lipases ativas e com alta atividade específica. . Essas enzimas em extrato bruto são capazes de catalisar reações de transesterificação, tendo conseguido produzir biodiesel com valores elevados. Esse trabalho trouxe um estudo inovador com fungos pouco avaliados para este fim. Estudos posteriores podem otimizar as condições para aumentar o teor de ésteres e reduzir os custos e, assim, ter aplicabilidade na indústria.

#### 4.5 Referências bibliográficas

- ABD-ALLA, M. H. *et al.* **Improvement of fungal lipids esterification process by bacterial lipase for biodiesel synthesis.** Fuel, Assiut, v. 160, p. 196–204, 15 nov. 2015. doi:10.1016/j.fuel.2015.07.080
- BANCERZ, R. *et al.* **New alkaline lipase from *Rhizomucor variabilis* : Biochemical properties and stability in the presence of microbial EPS.** Biotechnology and Applied Biochemistry, Lublin, v. 63, n. 1, p. 67–76, fev. 2016. doi: 10.1002/bab.1351
- BRAGA, Adelaide Correia. **Biotransformação do óleo de rícino em aromas por *Yarrowia lipolytica*.** 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biológica) - Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2009.
- CANET, A. *et al.* **Exploring substrate specificities of a recombinant *Rhizopus oryzae* lipase in biodiesel synthesis.** New Biotechnology, Barcelona, v. 39, p. 59–67, 25 out. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.003>
- FERRAZ, L. I. R. **Aplicação De Lipases Na Catálise De Reações De Interesse.** 2014. 122 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, 2014.
- FREITAS, M. F. M. **Produção De Lipases Por Leveduras Isoladas Do Bagaço De Caju Utilizando Fontes Alternativas De Carbono E Nitrogênio.** 2017. 104 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2017.
- LOPES D. B. *et al.* **Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately?** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 31, p. 608–613, 2011.

MOJZITA, D.; RANTASALO, A.; JÄNTTI, J. **Gene expression engineering in fungi.** *Current Opinion in Biotechnology*, Espoo, v. 59, p. 141–149, 1 out. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.04.007>

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. **Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture.** *Bioresource Technology*, v. 82, n. 1, p. 43–49, 1 mar. 2002.

SILVA, W. O. B. **Lipases de *Metarhizium anisopliae*: Purificação parcial, regulação e secreção durante o processo de infecção do carrapato bovino *Boophilus microplus*.** 2005. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.

SZCZĘSNA-ANTCZAK, M. *et al.* **Oil accumulation and in situ trans/esterification by lipolytic fungal biomass.** *Bioresource Technology*, Lodz, v. 265, p. 110–118, 1 out. 2018.

WÖSTEN, Han A. B. **Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials.** *Current Opinion Biotechnology*, Utrecht, v. 59, p. 65–70, 2019.

<https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2019.02.010>

## 5. Conclusão Geral

A pesquisa mostra que os fungos coletados do bagaço de cana-de-açúcar são capazes de produzir lipases. Entre eles, se destacam três melhores fungos, que, estatisticamente, não apresentam diferença entre si, pois os valores de atividade lipolítica específica são próximos ou até maiores do que os resultados encontrados na literatura, que utiliza o *p*-NPB como substrato. As lipases desses fungos estão ativas e conseguem catalisar reações de transesterificação, produzindo biodiesel a partir do próprio caldo bruto, não sendo necessário fazer a imobilização da enzima, podendo, assim, diminuir custos. O teor de éster obtido pelo fungo *P. formosus* II é promissor e futuros estudos podem ser feitos para otimizar a produção do biodiesel por meio dessa enzima, além de a lipase ter aplicações em diversos ramos da indústria, podendo ser estudada para outras aplicações.