

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**GUSTAVO FRANCISCO DE OLIVEIRA**

**PRODUÇÃO POR CULTIVO SUBMERSO E PARCIAL CARACTERIZAÇÃO DE  
UMA NOVA LIPASE DO FUNGO ENDOFÍTICO *Preussia africana***

**Alfenas/MG**

**2021**

GUSTAVO FRANCISCO DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO POR CULTIVO SUBMERSO E PARCIAL CARACTERIZAÇÃO DE  
UMA NOVA LIPASE DO FUNGO ENDOFÍTICO *Preussia africana*

Dissertação de mestrado apresentada  
como parte dos requisitos para obtenção  
do título de Mestre em Biotecnologia pela  
Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Biomoléculas

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Battaglia  
Hirata

Alfenas/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central - Sede

Oliveira, Gustavo Francisco de.

Produção por cultivo submerso e parcial caracterização de uma nova lipase do fungo endofítico *Preussia africana* / Gustavo Francisco de Oliveira. – Alfenas/MG, 2021.

50 f. : il. –

Orientadora: Daniela Battaglia Hirata

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade  
Federal de Alfenas, 2021.

Bibliografia.

1. Fungos. 2. Enzimas. 3. Biotecnologia. I. Hirata, Daniela Battaglia. II.

Título.

CDD-660.6

GUSTAVO FRANCISCO DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO POR CULTIVO SUBMERSO E PARCIAL CARACTERIZAÇÃO DE  
UMA NOVA LIPASE DO FUNGO ENDOFÍTICO *Preussia africana***

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovado em: 25 de novembro de 2021

Profa. Dra. Daniela Battaglia Hirata

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Olga Luisa Tavano

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior

Instituição: Universidade Federal de São Carlos



Documento assinado eletronicamente por Daniela Battaglia Hirata, Professor do Magistério Superior, em 25/11/2021, às 15:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Olga Luisa Tavano, Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Longevidade, em 25/11/2021, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por ALBERTO COLLI BADINO JUNIOR, Usuário Externo, em 25/11/2021, às 16:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o códigoverificador 0639621 e o código CRC 4ABA687E.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por sempre me dar saúde e disposição para correr atrás de meus objetivos, e por colocar a meu redor pessoas incríveis sem as quais não seria possível a conclusão desta etapa da minha vida.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem nas minhas decisões, e por serem tão presentes na minha vida, sempre dando todo o apoio necessário. Saber que eu posso contar com vocês independente do que aconteça me acalma e me traz um sentimento de imensa gratidão.

À minha orientadora, professora, às vezes “mãe”, e amiga Daniela por ter me acolhido como orientando em todos esses anos de graduação e pós-graduação. Obrigado por todo suporte e parceria ao longo da minha trajetória na Universidade e por sempre querer o melhor de mim e para mim. Ter você como orientadora fez toda diferença.

Aos meus amigos, que mesmo distantes se fizeram presentes quando eu mais precisava de um desabafo ou descontração. Sou muito grato pela amizade de todos vocês, a “família que eu escolhi”.

À minha terapeuta, que manteve minha mente sã nestes anos tão conturbados, de muita ansiedade e incertezas.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Em dois anos marcados eternamente por uma pandemia mundial, em que tantas pessoas perderam seus entes queridos, conseguir concluir um mestrado é uma vitória pessoal gigantesca. Foram longos meses de muita solidão e dedicação. O que já seria um grande desafio por si só, acabou se tornando algo muito mais complicado e desafiador. Portanto gostaria de agradecer também a todos profissionais da saúde e da ciência, pois sem eles não seria possível enxergarmos um fim para este pesadelo. Viva o SUS! Viva a Ciência! Viva a Biotecnologia!

“Quero realizar minha parte de trabalho verdadeiro e honesto no mundo... Acrescentar um pouquinho à soma de conhecimento humano que todos os bons homens do mundo têm acumulado desde que a vida começou. As pessoas que viveram antes fizeram tanto por mim, que quero demonstrar minha gratidão fazendo algo por aquelas que viverão depois. Parece-me que este é o único jeito de cumprir as obrigações para com a raça humana.”

Anne de Avonlea  
Lucy Maud Montgomery (1909)

## RESUMO

Endófitos são micro-organismos que vivem no interior de tecidos vegetais por pelo menos uma fração do seu ciclo de vida produzindo uma gama de enzimas e metabólitos secundários que poderão ser usados pela planta hospedeira, conferindo assim uma maior adaptabilidade ao vegetal. O objetivo do presente trabalho foi de estudar a produção de uma nova lipase extracelular produzida pelo fungo endofítico *Preussia africana* (*P. africana*), isolado a partir do ipê-roxo na região Sul de Minas Gerais, Brasil. Os ensaios foram conduzidos a fim de avaliar-se a influência de diferentes óleos indutores (girassol, algodão, milho, palmiste, canola e linhaça) e da relação carbono/nitrogênio (C/N de 11,73, 8,63 e 7,05) na produção por cultivo submerso, visando à produção majoritária de uma lipase extracelular. Os resultados mostraram que a produção majoritária de uma lipase de 14,5 kDa foi alcançada após 48 h de cultivo a 30 °C e 250 rpm, quando o óleo de girassol e uma relação de C/N de 8,63 foram usados no meio de cultivo. Ainda, a lipase produzida foi caracterizada quanto ao pH e temperatura ótimos, utilizando-se um planejamento fatorial com duas variáveis independentes. Apenas o pH foi estatisticamente significativo a 5% de significância, sendo que os melhores valores de atividade foram obtidos no intervalo de valores de pH de 5,0 a 7,0 (cerca de 28 U/mL). O intervalo estudado de temperatura (20 a 54 °C) não influenciou estatisticamente a atividade da lipase produzida, demonstrando que sua atividade catalítica não é afetada para uma ampla faixa de temperatura avaliada.

Palavras-chave: Fungos; Enzimas; Biotecnologia.

## ABSTRACT

Endophytes are microorganisms that live inside vegetable tissues for at least a fraction of their life cycle producing a wide range of enzymes and secondary metabolites that can be used by the host plant, providing a higher vegetable adaptability. The goal of the present work has been to study the production of a new extracellular lipase produced by the endophytic fungus *Preussia africana* (*P. africana*), isolated from Ipê-roxo, at the South of Minas Gerais region. The assays were conducted to evaluate the influence of different inductor oils (sunflower, cottonseed, corn, palm kernel, canola and linseed) and the Carbon/Nitrogen ratio (C/N of 11,73, 8,63, 7,05) in the production by submerged culture, aiming the majority production of one single extracellular lipase. The results showed that the majority production of one single lipase of 14,5 kDa was achieved after 48 h of growth, at 30 °C and 250 rpm, when sunflower oil and a C/N ratio of 8,63 were used in the culture medium. Still, the produced lipase was characterized as to optimum pH and temperature, using a factorial design for two independent variables. Only pH was statistically significant at 5% of significance, and the best activity values were obtained for pH values between 5,0 to 7,0 (about 28 U/mL). The studied temperature interval (from 20 to 54 °C) did not influence statistically the produced lipase activity, showing that its catalytic activity is unaffected for a wide range of temperature.

Key words: Fungus; Enzymes; Biotechnology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alguns exemplos de reações catalisadas por lipases .....	15
Figura 2 - Estrutura de alguns dos ácidos graxos que podem ser encontrados na natureza .....	17
Figura 3 - <i>Preussia africana</i> isolado a partir do ipê roxo, em placa de MEA..	23
Figura 4 - Fluxograma representativo do cultivo submerso .....	30
Figura 5 - Atividade hidrolítica e concentração de biomassa obtidas após 48 e 60 h de cultivo a 30 °C e 250 rpm de agitação, utilizando-se diferentes óleos vegetais .....	31
Figura 6 - Atividade hidrolítica (U/mL) e concentração de biomassa (g/L) para cultivos em 48 e 60 h, à 30 °C e 250 rpm, para diferentes relações de C/N, utilizando-se óleo de girassol como indutor e fonte de carbono.....	34
Figura 7 - Atividade hidrolítica, concentração de biomassa e pH do caldo ao longo de 84 h de cultivo à 30°C e 250 rpm, utilizando-se óleo de girassol como indutor e fonte de carbono e a razão de C/N de 8,63.....	35
Figura 8 - SDS-Page, para a lipase do <i>P. africana</i> após 48 h de cultivo, utilizando o óleo de girassol como fonte de carbono e indutor e a relação de C/N de 8,63 .....	37
Figura 9 - Gráfico de Pareto para o DCCR 22 executado para a determinação da temperatura e pH ótimos, utilizando-se a lipase purificada, produzida pelo <i>P. africana</i> .....	39
Figura 10 - Superfície de resposta mostrando a variação da atividade enzimática da lipase purificada, produzida pelo <i>P. africana</i> em função da variação do pH.....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Aplicações industriais das lipases e seus respectivos fungos produtores.....	16
Tabela 2 -	Relação de enzimas produzidas por diferentes espécies de fungos endofíticos, acompanhado da planta hospedeira .....	21
Tabela 3 -	Composição dos óleos vegetais em termos de porcentagem de ácidos graxos .....	26
Tabela 4 -	Composição dos meios de cultivo em % de nutrientes, de acordo com as diferentes relações C/N estudadas .....	27
Tabela 5 -	Variáveis do DCCR 2 <sup>2</sup> com seus respectivos níveis e valores reais.....	28
Tabela 6 -	Matriz do DCCR 2 <sup>2</sup> para a determinação da temperatura e pH ótimos, utilizando-se a lipase purificada, produzida pelo <i>P. africana</i> .....	38
Tabela 7 -	Coefficientes de regressão obtidos para DCCR 2 <sup>2</sup> , utilizando-se 5% de nível de significância .....	38
Tabela 8 -	ANOVA para o DCCR 22 utilizando-se apenas os coeficientes de regressão estatisticamente significativos a 5% de nível de significância.....	40

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
2.1 OBJETIVO	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>15</b>
3.1 LIPASES	15
3.1.1 <i>Estrutura e Metabolismo de Lipídeos</i>	17
3.1.2 <i>Efeito das fontes de carbono, nitrogênio e íons na produção de lipases</i>	18
3.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS	19
3.2.1 <i>Enzimas isoladas de fungos endofíticos</i>	20
3.2.2 <i>Preussia africana</i>	22
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>24</b>
4.1 MICRO-ORGANISMO	24
4.2 MEIOS DE CULTURA E CULTIVO	24
4.2.1 <i>Meio de Manutenção</i>	24
4.2.2 <i>Meio de Ativação</i>	25
4.2.3 <i>Meio de Inóculo</i>	25
4.2.4 <i>Meio de Produção</i>	25
4.3 PRODUÇÃO DE LIPASE VIA CULTIVO SUBMERSO	25
4.4 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO POR PRECIPITAÇÃO	26
4.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE COM DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS	26
4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE ALTERANDO A RELAÇÃO C/N	27
4.7 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E PH ÓTIMOS	27
4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA	28
4.9 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO PROTEÍNA	29
4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA	29
4.11 ANÁLISE DE ELETROFORESE (SDS-PAGE)	29
4.12 MEDIDA DO PH DO CALDO DE CULTIVO	29
4.13 FLUXOGRAMA DAS ETAPAS ENVOLVIDAS	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>31</b>
5.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE COM DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS	31
5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE ALTERANDO A RELAÇÃO C/N	33
5.3 ACOMPANHAMENTO DA PRODUÇÃO DE LIPASE COM O TEMPO	35
5.4 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE PRODUZIDA	36
5.5 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E PH ÓTIMOS	37

<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>42</b>
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Endófitos são micro-organismos que vivem na parte interna de tecidos vegetais, estabelecendo uma relação de mutualismo com suas plantas hospedeiras. Eles estão amplamente distribuídos pelo reino vegetal e podem produzir uma gama de compostos secundários biologicamente ativos desempenhando funções adaptativas para a planta, enquanto esta última fornece estrutura, suporte e nutrientes necessários para o desenvolvimento destes micro-organismos (ADELEKE; BABALOLA, 2021; ALI *et al.*, 2021).

O potencial de fungos endofíticos em produzirem biomoléculas das mais diversas classes de produtos naturais, que encontram aplicações na indústria farmacêutica é bem conhecido e relatado na literatura, porém poucos estudos têm se dedicado às enzimas, que também são produzidas por esses fungos, assim como suas possibilidades de aplicações em diferentes setores industriais (YASSER *et al.*, 2019).

Lipases são enzimas que, naturalmente, catalisam em meios aquosos a hidrólise das ligações ésteres de ácidos carboxílicos presentes nos triacilglicerídeos, entretanto na ausência de água elas também podem realizar reações de síntese, de acordo com o meio em que se encontram e os substratos que são fornecidos (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017; HASAN *et al.*, 2006).

Suas propriedades, tais como alta eficiência catalítica, alto grau de especificidade, capacidade de acelerar reações químicas específicas sem a formação de subprodutos indesejáveis e condições de operação suaves, as tornam extremamente versáteis e muito atraentes para diferentes aplicações industriais como na síntese de biodiesel e biolubrificantes, na indústria de detergentes, na síntese de ésteres de aroma e de cosméticos, dentre outras aplicações (CHANDRA *et al.*, 2020; HASAN *et al.*, 2006; SHARMA *et al.*, 2001).

As lipases podem ser encontradas em animais, vegetais e micro-organismos, sendo que as encontradas nos micro-organismos apresentam vantagens como facilidade para a produção em larga escala, devido ao rápido crescimento dos micro-organismos e maior facilidade para manipulação genética (CHANDRA *et al.*, 2020). Além disso, as lipases microbianas possuem uma grande diversidade em suas propriedades catalíticas, podendo apresentar especificidades para diferentes tipos de substratos (CHANDRA *et al.*, 2020; SHARMA; CHISTI; BANERJEE; 2001).

As lipases utilizadas em larga escala são geralmente produzidas por cultivo submerso, pois esta tecnologia apresenta como vantagem uma maior facilidade de monitoramento e controle do processo fermentativo (SHARMA; CHISTI; BANERJEE; 2001). A composição do meio de cultivo também é um fator importante, que afeta diretamente a produção de lipases, sendo bem conhecida a influência da concentração dos componentes e de diferentes fontes de carbono (FREIRE et al, 1997; GAO; BREUIL; 1995; LAKSHMI et al, 1999; SHARMA; CHISTI; BANERJEE; 2001), de nitrogênio (SHARMA; CHISTI; BANERJEE; 2001; KUMAR; GUPTA; 2008), de íons metálicos e do tipo de indutor utilizado (OBRADORS *et al.*, 1993; WANG *et al.* 1995) na produção de lipases extracelulares por diferentes micro-organismos.

Além disso, é comum que um único micro-organismo possa produzir múltiplas formas de lipase, que podem possuir características catalíticas, estabilidade e massa molar distintas entre si (JACOBSEN *et al.* 1989; LOTTI et al, 1998; SHIMADA *et al.*, 1992).

Desta forma, buscar um meio de cultivo que possibilite a produção majoritária de uma única lipase é vantajoso, pois dispensa os custos com as etapas de separação subsequentes, que encarecem o processo. Em estudo recente, o nosso grupo de pesquisa (SOARES *et al.*, 2018) isolou e identificou o fungo endofítico *P. africana* a partir do ipê roxo, que se mostrou capaz de produzir lipases extracelulares quando colocado em meio de cultivo submerso na presença de um óleo indutor. Não há outros relatos na literatura relacionados às lipases produzidas por este fungo além deste.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO

O objetivo deste presente trabalho foi de estudar a produção de uma nova lipase extracelular produzida pelo fungo endofítico *Preussia africana*, isolado a partir do ipê-roxo, na região Sul do Estado de Minas Gerais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este trabalho envolveu diversos objetivos específicos, todos em conformidade com o objetivo geral:

- a) Verificar o efeito da escolha do óleo indutor na produção de lipase;
- b) Verificar o efeito da relação Carbono/Nitrogênio na produção de lipase;
- c) Realizar o acompanhamento da produção de lipase com o tempo;
- d) Purificar a lipase produzida;
- e) Caracterizar a lipase produzida quanto a temperatura e pH ótimos utilizando o planejamento experimental.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 LIPASES

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas pertencentes à classe das hidrolases que são capazes de hidrolisar triglicerídeos de cadeia longa em ácidos graxos e acilgliceróis quando em meio aquoso (MAKAREVICIENE; SENDZIKIENE; GAIDE, 2021). Essas enzimas também podem catalisar reações de síntese, como esterificação, interesterificação e transesterificação quando colocadas em meio orgânico. Esse grupo de enzimas é considerado como um dos mais importantes biocatalisadores dentro da biotecnologia (AMOBONYE *et al.*, 2020). Na Figura 1, encontram-se as possíveis reações que podem ser catalisadas pelas lipases de acordo com a composição do meio reacional.

De maneira geral, as lipases não requerem cofatores, atuam em ampla faixa de pH, são estáveis à altas temperaturas, possuem elevada especificidade e propriedades de região, quimio e enantiosseletividade que fazem com que sejam amplamente aplicáveis em processos industriais (MESSIAS *et al.*, 2011). Na Tabela 1 encontram-se listadas algumas lipases comerciais de origem microbiana, acompanhadas de suas respectivas aplicações.

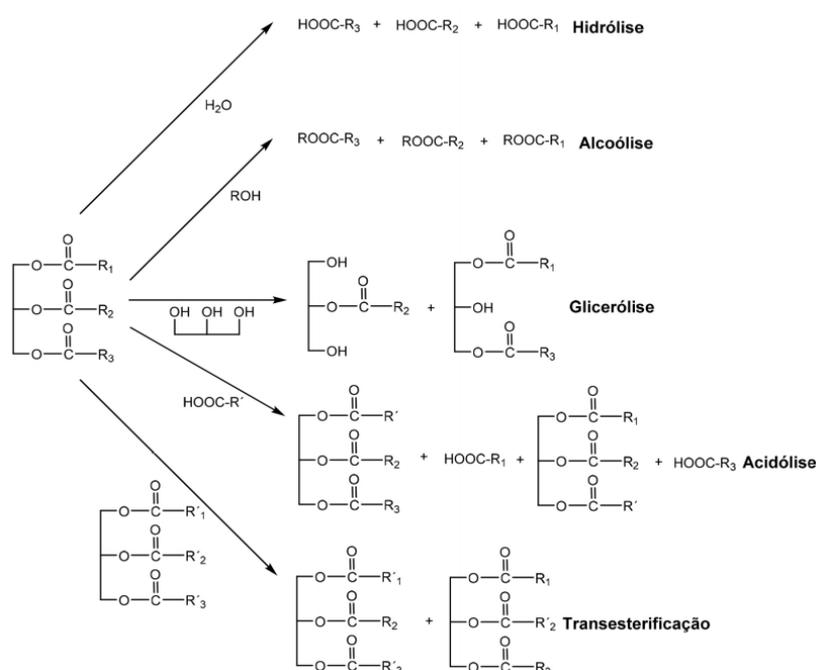


Figura 1 - Fonte: Cortez; De Castro; Andrade, 2017.

Legenda: Alguns exemplos de reações catalisadas por lipases.

Tabela 1 - Aplicações industriais das lipases e seus respectivos fungos produtores.

Fonte	Indústria	Aplicações	Referências
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> , <i>Penicillium sp.</i>	Laticínios	Melhorar sabor do queijo	
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Farmacêutica	Casos de deficiência em enzimas pancreáticas e indigestão	Monteiro, V.N; Silva, R. N.; (2009)
<i>Aspergillus niger</i>	Cosmética	Limpeza profunda da pele, tratamento de acne e caspa	
<i>Penicillium restrictum</i> , <i>Candida rugosa</i>	Tratamento de efluentes	Redução do teor de lipídeos para facilitar a transferência de massa e diminuição da DBO e DQO	Mendes <i>et al.</i> (2005)
<i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Mucor circinelloides</i>	Energia	Produção de biodiesel via transesterificação de óleos e gorduras	Cortez, D.V; de Castro, H.F.; Andrade, G. S.S.; (2017)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Detergente	Remoção de manchas de óleos/gorduras	Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D.; (2004)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Panificação	Melhoramento da cor e textura da massa, ação emulsificante	
<i>Mucor miehei</i> , <i>Candida antarctica</i>	Oleoquímica	Conversão de óleos e gorduras em equivalentes da manteiga de cacau	
<i>Rhizomucor meihei</i>	Cosmética	Produção de emolientes para produtos de cuidado pessoal	Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A.; (2006)
<i>Rhizomucor meihei</i>	Chá	Diminuição do teor de lipídeos e desenvolvimento de sabor	
<i>Rhizopus nodosus</i>	Têxtil	Desengorduramento do couro	
<i>Geotrichum candidum</i>	Química Fina	Produção de ésteres de aroma via esterificação	Ramos <i>et al.</i> (2015)

Os processos enzimáticos catalisados por lipases ainda encontram algumas limitações como o custo final da enzima, sua estabilidade e perdas na reutilização, portanto, a busca por novos micro-organismos, que possam servir como fonte para novos e mais robustos biocatalisadores, é de suma importância (ROCHA *et al.*, 2020).

### 3.1.1 Estrutura e Metabolismo de Lipídeos

Os lipídeos são um grupo de compostos que, apesar de apresentarem diferentes estruturas e composições químicas, apresentam uma característica em comum: são insolúveis em meios aquosos. As gorduras e óleos que são usados pelos micro-organismos como fonte de energia geralmente são derivados de ácidos graxos. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeia longa, podendo esta cadeia ser completamente saturada ou com algumas insaturações, linear ou ramificada (NELSON; COX, 2011). Na Figura 2 são apresentadas algumas estruturas de ácidos graxos que podem ser encontradas em diferentes tipos de óleos e gorduras.

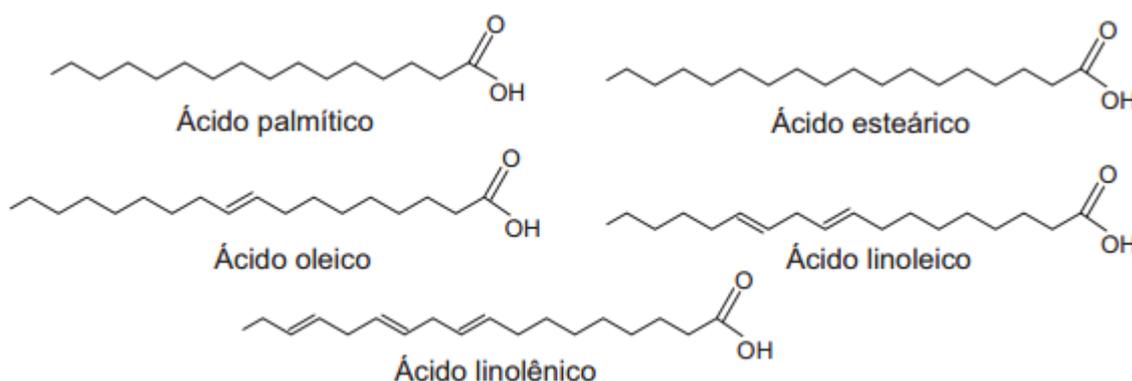


Figura 2 - Fonte: Nelson; Cox, 2011.

Legenda: Estrutura de alguns dos ácidos graxos que podem ser encontrados na natureza. Adaptado de (NELSON; COX, 2011).

Antes de penetrar a membrana celular microbiana, os óleos e gorduras são primeiramente hidrolisados em ácidos graxos livres e glicerol pela ação das lipases. É importante que aconteça a modificação destas moléculas antes da sua internalização e transporte até o local da sua primeira oxidação. Quando a fonte de carbono se trata de um hidrocarboneto, o micro-organismo recorre à via lipolítica e à gliconeogênese para produção de ácidos graxos ou sacarídeos (BACCIOTTI, 2015).

De maneira geral os ácidos graxos são armazenados como lipídeos neutros, podendo estes serem utilizados para produção de energia, como blocos de construção para formação da membrana ou como mensageiros celulares (MURPHY, 2001).

A  $\beta$ -oxidação é a principal via metabólica utilizada na degradação de ácidos graxos para geração de energia, estando-a presente em praticamente todos os eucariotos.

Apesar disso, ela pode acontecer em diferentes compartimentos celulares e possuir diferentes características de acordo com a espécie do organismo (SHEN; BURGER, 2008).

De maneira geral, no primeiro estágio da  $\beta$ -oxidação ocorre a remoção de sucessivas unidades de dois carbonos do ácido graxo na forma de acetil-CoA, iniciando-se pela extremidade carboxila da cadeia. Em seguida, os resíduos de acetila são oxidados até  $\text{CO}_2$  por meio do ciclo do ácido cítrico. Nestes dois primeiros estágios ocorre a liberação de elétrons, que são transportados por meio dos transportadores NADH e  $\text{FADH}_2$  para o terceiro estágio, que é a cadeia respiratória mitocondrial. No terceiro e último estágio estes elétrons são transportados até o oxigênio com a fosforilação concomitante do ADP para ATP (NELSON; COX, 2011).

Portanto, a energia liberada a partir da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos é conservada na forma de ATP, podendo ser utilizada pelos organismos para o seu próprio desenvolvimento.

### *3.1.2 Efeito das fontes de carbono, nitrogênio e íons na produção de lipases*

Há diversos estudos disponíveis nos quais os autores visaram a determinação das melhores condições nutricionais e de cultivo para produção de lipases, uma vez que a produção pode ser influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, pelo pH do cultivo e temperatura de crescimento, pela agitação e aeração empregados e pelo volume do inóculo (ELIBOL; OZER, 2001).

Fontes de carbono lipídicas são essenciais para se obter um bom rendimento na produção de lipases por micro-organismos, funcionando como indutores. As fontes de carbono provenientes de glicose e outros sacarídeos, apesar de influenciarem positivamente no crescimento celular do micro-organismo, não induzem a produção de lipases extracelulares, na maioria dos casos relatados, sendo que quando se utiliza óleos vegetais como fonte de carbono, verifica-se a produção de lipases em elevados níveis (GAO; BREUIL; 1995).

Os óleos vegetais, quando adicionados ao meio de cultivo em pequenas quantidades, podem servir tanto como fonte de carbono como indutores na produção de lipases por diferentes espécies de micro-organismos e, como estes óleos variam em composição de ácidos graxos, cada óleo vegetal pode induzir a produção de diferentes lipases em distintos micro-organismos (SHARMA; CHISTI; BANERJEE; 2001). Dessa

forma, justifica-se a importância de se realizar diferentes experimentos a fim de se determinar qual óleo vegetal é o mais adequado para cada micro-organismo, quando se deseja atingir um maior rendimento na produção de lipases.

Com relação à fonte de nitrogênio, geralmente os micro-organismos fornecem maiores rendimentos na produção de lipases quando há uma combinação de fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio. As fontes orgânicas mais comumente utilizadas são a peptona, o extrato de levedura, água de maceração de leguminosas (como milho ou soja) e ureia, porém enquanto para alguns micro-organismos determinado composto pode aumentar a resposta na produção de lipases, para outro o mesmo composto pode inibir a sua produção (SHARMA; CHISTI; BANERJEE; 2001).

As fontes de nitrogênio inorgânicas sozinhas não induzem tão fortemente a produção de lipases, portanto, faz-se necessária sua combinação com uma fonte orgânica. Diferentes sais inorgânicos podem influenciar positivamente ou negativamente a produção de lipases, sendo que cada micro-organismo pode responder diferentemente à adição ou privação de determinado íon, porém de maneira geral íons  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  são os de maior relevância quando se deseja induzir a produção de lipases pelo micro-organismo (WANG *et al.* 1995).

As condições de agitação e aeração também afetam a quantidade total de lipases produzidas, sendo que essas condições podem variar amplamente de acordo com micro-organismo produtor (80 a 750 rpm e de 1 a 2 vvm) (BURKERT *et al.*, 2005).

### 3.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS

O termo endófito vem do grego, onde “*endo*” refere-se a interior e “*fito*” a planta. Ele se refere a todos os micro-organismos, que pelo menos em uma fração do seu ciclo de vida, colonizam a parte interna de tecidos vegetais sem causar nenhum sintoma negativo ou ser prejudicial à planta hospedeira (PATIL *et al.*, 2015). Esses micro-organismos podem ser bactérias, fungos, vírus ou actinomicetos e podem ser encontrados em praticamente todos os biomas, desde o Ártico até os Trópicos (ARNOLD, 2007). Além de colonizarem as partes internas da planta, desde folhas e caules até flores e frutos (FOUDA *et al.*, 2015), eles são capazes de produzir compostos bioativos e enzimas, promover o crescimento do hospedeiro e oferecer resistência a estresses bióticos e abióticos ao vegetal hospedeiro (ROCHA *et al.*, 2020).

A relação entre o endófito e o hospedeiro pode variar de fitopatogênese latente a simbiose mutualística (PATIL *et al.*, 2015). O endófito se apropria da estrutura do vegetal para conseguir nutrientes e proteção, enquanto produz enzimas e outros metabólitos secundários frente a situações de estresse nutritivo ou presença de outros micro-organismos patogênicos (TAN; ZOU, 2001), conferindo assim, uma maior adaptabilidade do vegetal a diferentes habitats.

Estima-se que fungos combinam-se com espécies vegetais há aproximadamente 400 milhões de anos (JAGANNATH *et al.*, 2021) e, embora a primeira descoberta de um endófito tenha sido feita em 1904, estes micro-organismos não receberam tanta atenção até a recente descoberta da sua importância ecológica e de seu potencial na produção de metabólitos secundários com diferentes funções biológicas, os quais têm grande importância na área farmacêutica (GUNATILAKA, 2006; MATTOO; NONZOM, 2021). De maneira geral, mais de cem anos de pesquisa nesta área sugerem que a maioria das plantas de ecossistemas naturais são simbióticas com micorrizas e/ou fungos endofíticos (RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

Uma infinidade de metabólitos bioativos de diferentes classes, tais como flavonoides, quinonas, alcaloides, compostos fenólicos, entre outros, que são derivados de fungos endofíticos, têm sido reportados continuamente na literatura. Estas moléculas são de grande importância para a medicina e indústria farmacêutica, pois podem apresentar propriedades antioxidante, antimicrobiana, antidiabética, antiviral ou até mesmo antitumoral (RAO; KAMALRAJ; JAYABASKARAN, 2019).

### 3.2.1 Enzimas isoladas de fungos endofíticos

Assim como outros micro-organismos que dominam os tecidos vegetais, os fungos endofíticos sintetizam enzimas extracelulares como um mecanismo de resistência (JAGANNATH *et al.*, 2021). Uma maior ênfase têm sido dada no uso de fungos ao invés de bactérias porque além de produzirem maiores quantidades, as enzimas fúngicas podem ser secretadas no meio, facilitando a sua extração e purificação (VÁZQUEZ-MONTOYA *et al.*, 2020). A capacidade dos fungos de crescerem e produzirem enzimas em culturas axênicas (puras, com apenas um único micro-organismo) dentro de 2 a 4 semanas também os tornam mais econômicos na hora da seleção do micro-organismo (AYOB; SIMARANI, 2016).

Algumas dessas enzimas são responsáveis pela ligação do endófito ao hospedeiro (AMOBONYE *et al.*, 2020), enquanto outras são responsáveis por clivar macromoléculas como amido, proteínas e gorduras, a fim de se obter os nutrientes necessários para a sobrevivência do micro-organismo (SOPALUN; IAMTHAM, 2020). Uma relação entre diferentes enzimas produzidas por fungos endofíticos e seus respectivos hospedeiros se encontra na Tabela 2.

Tabela 2 - Relação de enzimas produzidas por diferentes espécies de fungos endofíticos, acompanhado da planta hospedeira.

(continua)

Fungo Endofítico	Planta Hospedeira	Tipos de Enzimas Produzidas	Referências
<i>Stemphylyum lycopersici</i> HB13	<i>Humiria balsamifera</i>	Lipase	Rocha et al (2019)
<i>Sordaria</i> sp. TB1	<i>Tocoyena bulata</i>	Lipase	
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Ricinus communis</i> L.	Lipase	Oliveira et al (2014)
<i>Preussia africana</i>	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Lipase	Souza et al (2018)
<i>Penicillium funiculosum</i>		Celulase	
<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Moringa oleifera</i>	Celulase	Vázquez-Montoya et al (2020)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		Celulase	
<i>Penicillium daleae</i>	<i>Taxus wallichiana</i>	Fosfatase e Fitase	Adhikari P; Pandey A; (2019)
<i>Aspergillus versicolor</i>		Fosfatase e Fitase	
<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Costus igneus</i>	Amilase	
<i>Drechslera hawaiiensis</i>	<i>Adathoda vasica</i>	Amilase, lipase e protease	Amirita et al (2012)
<i>Colletotrichum carssipes</i>	<i>Lawsonia inerims</i>	Amilase, protease	

(conclusão)

Fungo Endofítico	Planta Hospedeira	Tipos de Enzimas Produzidas	Referências
<i>Curvularia vermiformis</i>	<i>Coleus aromaticus</i>	Celulase, lipase, protease	Amirita et al (2012)
<i>Aspergillus japonicus</i>		Celulase, pectinase, protease, xilanase	
<i>Fusarium lateritium</i>	<i>Opuntia ficus-indica</i> M.	Celulase, protease, xilanase	Bezerra et al (2012)
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>		Celulase, protease, xilanase	
<i>Colletotrichum siamense</i>	<i>Viola odorata</i>	Protease	Katoch et al (2017)
<i>Xylaria curta</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Protease	Meshram et al (2017)

### 3.2.2 *Preussia africana*

O gênero *Preussia* é um táxon ambientalmente diverso, mas pouco conhecido. Membros do gênero podem ser coprófilos, vivendo em fezes de animais ou em restos de vegetais ou endofíticos vivendo no interior de plantas numa relação do tipo mutualística (MAPPERSON *et al.*, 2014).

A espécie *Preussia africana* (*P. africana*) foi isolada primeiramente por Arenal, Platas e Peláez (2005) a partir de substratos coprófilos e de plantas mediterrâneas provenientes das Ilhas Canárias, Tanzânia e África do Sul. Brum *et al.* (2012) também relataram a presença de *P. africana* como endófito em extratos vegetais de *Vitis labrusca* L, na região de São Paulo, Brasil.

A Figura 2 mostra o fungo *P. africana* isolado por Souza *et al.* (2018) crescido no meio de manutenção (extrato de malte – MEA), após 5 dias de incubação a 30 °C.



Figura 3 – Fonte: do próprio autor

Legenda: *Preussia africana* isolado a partir do ipê roxo, em placa com meio MEA (ágar extrato de malte)

Souza *et al.* (2018) isolaram e identificaram o micro-organismo *P. africana* em extratos de *Handroanthus impetiginosus*, uma planta mais popularmente conhecida como ipê roxo. Os autores identificaram que o micro-organismo possuía potencial para produção de lipases extracelulares (SOUZA *et al.*, 2018), sendo este o único trabalho até o momento que relata a produção das lipases produzidas por *P. africana*.

## 4 METODOLOGIA

A goma arábica foi adquirida da Synth® (São Paulo, SP, Brasil). Os óleos vegetais de girassol, canola e milho foram adquiridos no mercado local (Alfenas, MG, Brasil). Os óleos refinados de algodão, de palmiste e de linhaça foram adquiridos da Campestre Indústria e Comércio de Óleos Vegetais (São Bernardo do Campo, SP, Brasil), Agropalma (Belém, PA, Brasi) e Gran Oils (São Paulo, SP, Brasil) respectivamente. Os meios de cultivo foram adquiridos da Himedia (Sumaré, SP, Brasil). Os reagentes de eletroforese foram obtidos na Bio-Rad (Itapevi, SP, Brasil). Todos os outros reagentes químicos e solventes orgânicos eram de qualidade analítica e foram adquiridos da Synth (São Paulo, SP, Brasil).

### 4.1 MICRO-ORGANISMO

O fungo endofítico *P. africana*, isolado a partir do Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*) e identificado por Souza *et al.* (2018) (código de acesso no GenBank: SAMN 06350896; CPQBA 1304/16 DRM – 01) encontrava-se disponível no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL-MG. O fungo foi mantido no meio de manutenção (MEA) à temperatura de 4°C em geladeira. Repiques foram feitos regularmente (15 em 15 dias) para que o micro-organismo não perdesse sua viabilidade.

### 4.2 MEIOS DE CULTURA E CULTIVO

#### 4.2.1 Meio de Manutenção

Para manutenção e conservação do micro-organismo, utilizou-se o ágar de extrato de malte (MEA), composto por 2% (m/v) de extrato de malte, 0,5% (m/v) de peptona de caseína, e 1,5% (m/v) de ágar solúvel. Após o repique, o micro-organismo crescia por no mínimo 5 dias à 30°C antes de ser armazenado na geladeira.

#### 4.2.2 Meio de Ativação

Para ativação do micro-organismo, utilizou-se o ágar sabouraud dextrose (SDA), composto por 6,5% (m/v) de SDA solúvel. Após o repique, o micro-organismo crescia por no mínimo 5 dias à 30°C antes de ser transferido para meio de inóculo.

#### 4.2.3 Meio de Inóculo

O meio de inóculo, de pH 6,0, foi composto por 2% (m/v) de peptona de caseína, 0,1% (m/v) de extrato de levedura, 0,05% (m/v) de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>), 0,05% (m/v) de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e 1% (v/v) de óleo vegetal (Souza *et al.*, 2018).

#### 4.2.4 Meio de Produção

O meio de cultivo, de pH 6,0, para produção de lipases foi composto inicialmente por 2% (m/v) de peptona de caseína, 0,1% (m/v) de extrato de levedura, 0,05% (m/v) de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>), 0,05% (m/v) de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), 0,05% (m/v) de nitrato de cálcio (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,05% (m/v) de fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,05% (m/v) de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), 2% (v/v) de óleo vegetal (C/N=11,73) e 10% (v/v) de inóculo (GOMBERT *et al.*, 1999; KUMAR *et al.*, 2008) A porcentagem de óleo vegetal foi variada posteriormente para estudar a relação C/N na produção de lipases.

### 4.3 PRODUÇÃO DE LIPASE VIA CULTIVO SUBMERSO

O cultivo submerso foi realizado em shaker orbital rotativo com agitação constante de 250 rpm e temperatura de 30 °C (KUMAR *et al.*, 2008). Foram utilizados enlermeyers de 1 L, sendo que apenas 10% do volume (100 mL) foi utilizado para garantir que a transferência de oxigênio não fosse um fator limitante do processo.

Após a ativação do micro-organismo, em placas contendo o ágar sabouraud dextrose (SDA) e seu crescimento (5 dias), uma colônia de 5 mm de diâmetro foi transferida para meio de inóculo previamente autoclavado. Após 48 h de crescimento do micro-organismo no meio de inóculo, foi adicionado 10 mL deste a 90 mL do meio de produção previamente autoclavado. Ao final do cultivo o caldo foi filtrado à vácuo utilizando-se papel de filtro Whatman n° 44 para a remoção das células, sendo o filtrado denominado extrato bruto e utilizado em estudos posteriores.

#### 4.4 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO POR PRECIPITAÇÃO

A precipitação da lipase foi realizada com acetona de acordo com a metodologia descrita por Ferreira *et al.* (2018). A acetona a 8°C foi utilizada numa proporção caldo enzimático de 2:1 (v/v). Após adição de acetona, o sistema foi centrifugado por 15 minutos a 2.000 rpm para separação das fases. Após a centrifugação, o sobrenadante foi colocado novamente em contato com uma nova fase do solvente e o processo de precipitação foi repetido. Os precipitados resultantes das duas fases de precipitação foram coletados, re-suspendidos com tampão fosfato 100 mM de pH 7,0 e submetidos à análise da atividade hidrolítica para determinação da atividade recuperada da enzima purificada. Também foi realizada a determinação da quantidade de proteína presente nos precipitados para o cálculo da atividade específica.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE COM DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS

Foram realizados ensaios nos tempos de 48 e 60 h de cultivo utilizando diferentes óleos vegetais como ambos, indutores e fontes de carbono. Os óleos utilizados foram de algodão, palmiste, girassol, canola, milho e linhaça. Os ensaios foram realizados em triplicata e após as amostras serem retiradas, os Erlenmeyers não voltavam ao shaker. Para todos os ensaios foram determinadas a atividade hidrolítica e a concentração de biomassa produzida. A atividade hidrolítica foi utilizada também para o cálculo da produtividade em U/(mL.h) nos cultivos submersos.

A composição, em porcentagens de ácidos graxos, de cada óleo vegetal utilizado encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição dos óleos vegetais em termos de porcentagem de ácidos graxos.

Óleo Vegetal	Ácidos Graxos (%)				
	Oleico (C18:1)	Linoleico (C18:2)	Palmítico (C16:0)	Esteárico (C18:0)	Linolênico (C18:3)
Algodão	19,00	54,00	24,30	2,70	0,00
Palmiste	37,00	12,00	49,00	2,00	0,00
Girassol	20,00	70,00	8,36	1,64	0,00
Canola	58,00	25,00	5,20	1,80	10,00
Milho	25,80	59,80	11,20	1,70	1,50
Linhaça	18,50	17,20	6,60	4,50	53,20

Fonte: GIOIELLI, L.A. 1997; POPA *et al.*, 2012.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE ALTERANDO A RELAÇÃO C/N

A produção de lipases em diferentes relações C/N foi avaliada. As relações C/N estudadas foram de 11,73 (inicial – descrita no item 4.2.4. Meio de Produção) 8,63 e 7,05 (um exemplo de cálculo para a relação C/N encontra-se no Apêndice A). O óleo de girassol foi utilizado como fonte de carbono e indutor e as composições do meio de produção para cada relação C/N encontram-se na Tabela 4. A relação de C/N na qual foi encontrada a maior atividade de lipases foi selecionada posteriormente, no acompanhamento da produção com o tempo, sendo retiradas amostras de 12 em 12 horas ao longo de 84 horas de cultivo. Os ensaios foram realizados em triplicata. Em todos os ensaios foram determinadas a atividade hidrolítica, a concentração da biomassa e foi medido o valor do pH no caldo de cultivo.

Tabela 4 - Composições dos meios de cultivo em % (m/v) de nutrientes, de acordo com as diferentes relações C/N estudadas.

Componente	Razão C/N		
	11,73	8,63	7,05
Peptona de Caseína	2,00%	2,00%	1,50%
Extrato de Levedura	0,10%	0,10%	0,00%
NaNO <sub>3</sub>	0,05%	0,05%	0,15%
MgSO <sub>4</sub>	0,05%	0,05%	0,05%
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,05%	0,05%	0,05%
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05%	0,05%	0,05%
CaCl <sub>2</sub>	0,05%	0,05%	0,05%
Óleo Vegetal	2,00%	1,00%	0,50%

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E PH ÓTIMOS

O planejamento fatorial do tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) com duas variáveis (temperatura e pH) com três pontos centrais e quatro pontos axiais, totalizando 11 ensaios, foi realizado no intuito de se determinar a temperatura e pH ótimos para a atividade da lipase purificada. Os valores reais e codificados de temperatura e pH encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Variáveis do DCCR 2<sup>2</sup> com seus respectivos níveis e valores reais

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
x <sub>1</sub> Temperatura (°C)	20	25	37	49	54
x <sub>2</sub> pH	4,0	5,0	7,0	9,1	10,0

Para se determinar a influência do pH na atividade da lipase livre foram utilizados os tampões acetato de sódio (pH 4 e 5), fosfato de sódio (pH 7) e carbonato de sódio (pH 9,1 e 10), todos na concentração de 100 mM.

As análises de atividade hidrolítica foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.8, variando-se o tampão e a temperatura dos ensaios.

Os resultados foram analisados por meio do software Protimiza Experimental Design (2014) e a análise de variância (ANOVA) foi utilizada para estimar os parâmetros estatísticos e se avaliar se o modelo matemático gerado foi capaz de prever os valores experimentais de forma adequada. A validação do planejamento foi realizada para a condição ótima obtida (pH 5,0 e temperatura de 25°C), em triplicata.

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA

A atividade hidrolítica foi medida pelo método de hidrólise da emulsão do óleo de oliva, de acordo com Ferreira *et al.* (2018). O substrato foi preparado com óleo de oliva e água destilada na proporção (1:1 m/m), e 7% de goma arábica (em relação a massa de óleo de oliva utilizada) e homogeneizado utilizando-se um mixer (Arno, 400W). A reação foi conduzida a 37°C sob agitação constante de 200 rpm durante 5 minutos, sendo utilizado 5 mL desse substrato, 4 mL de tampão fosfato 100 mM a pH 7,0 e 1 mL do extrato bruto. O teste em branco foi realizado substituindo-se a amostra por 1 mL de caldo de cultivo autoclavado. Ao final dos 5 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 10 mL de uma solução contendo álcool e acetona (1:1). Os ácidos graxos liberados na reação foram titulados com NaOH 20 mM, utilizando-se fenolftaleína como indicador e a atividade hidrolítica foi determinada utilizando-se a Eq. (1). Uma unidade internacional (U) de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de FFA (ácidos graxos livres) por minuto nas condições experimentais descritas acima.

$$Atividade \left( \frac{U}{mL} \right) = \frac{(V_A - V_B) * 1000 * C_{NaOH}}{t * V_{am}} \quad Eq (1)$$

Sendo  $V_A$  o volume de NaOH gasto na titulação da amostra,  $V_B$  o volume de NaOH gasto na titulação do branco,  $C_{NaOH}$  a molaridade da solução de NaOH utilizada,  $t$  o tempo de reação (5 min) e  $V_{amo}$  o volume de caldo adicionado (1 mL).

A atividade determinada também foi utilizada para o cálculo da taxa de produção de lipase (U/mL.h) nos cultivos submersos.

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO PROTEÍNA

A quantidade de proteína presente nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976), sendo utilizado como padrão a proteína BSA (albumina sérica bovina).

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA

Ao término do cultivo o caldo foi filtrado à vácuo, utilizando-se papel de filtro Whatman nº 44, seguido de lavagem com água destilada. As células foram mantidas em estufa a 45 °C por 72 h ou até que a pesagem da massa fosse constante. A biomassa seca também foi utilizada para o cálculo da produção específica (U/g de biomassa).

#### 4.11 ANÁLISE DE ELETROFORESE (SDS-PAGE)

A análise de SDS-PAGE foi realizada em um Kit Mini-Protean II Dual-Slab Cell (Bio-Rad, USA), de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). As análises foram realizadas utilizando gel de poliacrilamida 12% (m/v), e os géis foram revelados com Coomassie Brilliant Blue R-250. Foram utilizados como padrão marcadores moleculares na faixa de 14,4 a 97,4 kDa (Bio-Rad, USA).

#### 4.12 MEDIDA DO PH DO CALDO DE CULTIVO

A medida do pH do caldo de cultivo foi realizada após a filtração do mesmo, utilizando tira universal de pH (Kasvi K36-104).

## 4.13 FLUXOGRAMA DAS ETAPAS ENVOLVIDAS

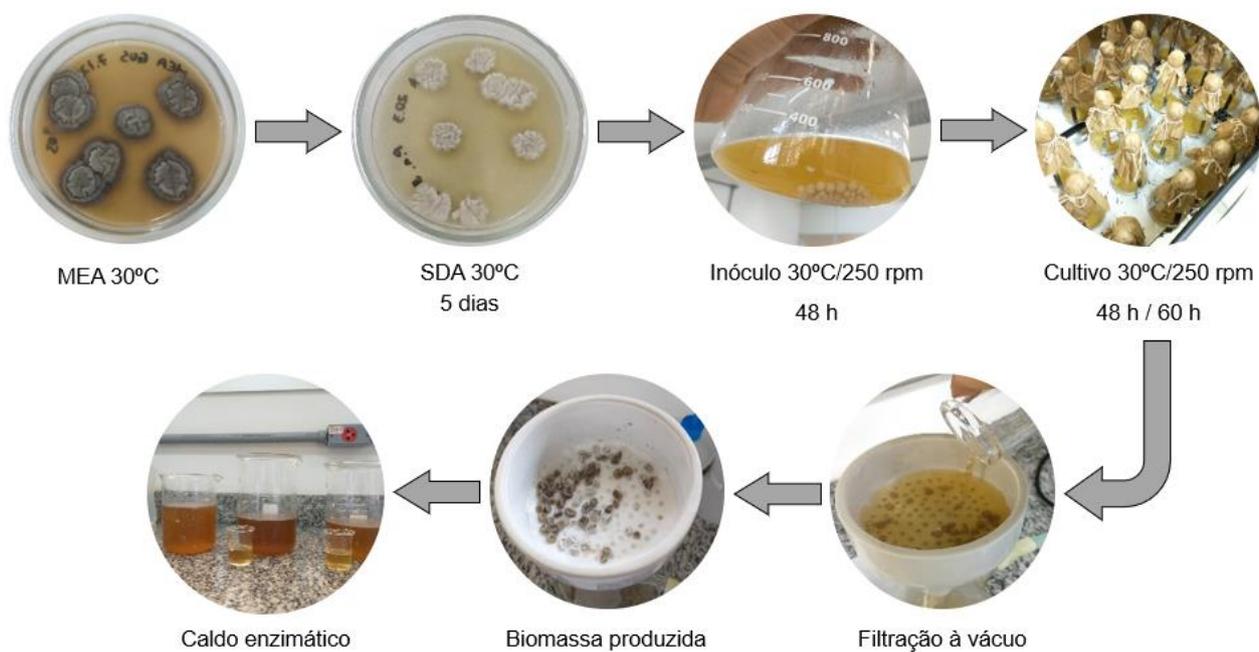


Figura 4 - Fluxograma representativo do cultivo submerso

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE COM DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS

A produção de lipases por *P. africana* foi avaliada variando-se o tipo de óleo vegetal que foi utilizado tanto como indutor, quanto como fonte de carbono no meio de produção. Para que haja a metabolização dos ácidos graxos pelo fungo para a geração de energia pelo mecanismo da  $\beta$ -oxidação é preciso que os ácidos graxos estejam livres no meio de cultivo, para atravessar a membrana celular do micro-organismo.

Assim, é fundamental que o fungo seja capaz de produzir lipases capazes de hidrolisar os triacilglicerídeos dos óleos vegetais presentes no meio de produção (OBRADORS *et al.*, 1993). Os óleos vegetais avaliados foram de algodão, girassol, palmiste, milho, canola e linhaça. A produção foi avaliada em dois tempos distintos de cultivo (48 e 60 h), na temperatura de 30°C e 250 rpm de agitação. Os resultados obtidos para a atividade enzimática (U/mL) e concentração de biomassa (g/L) estão representados na Figura 5.

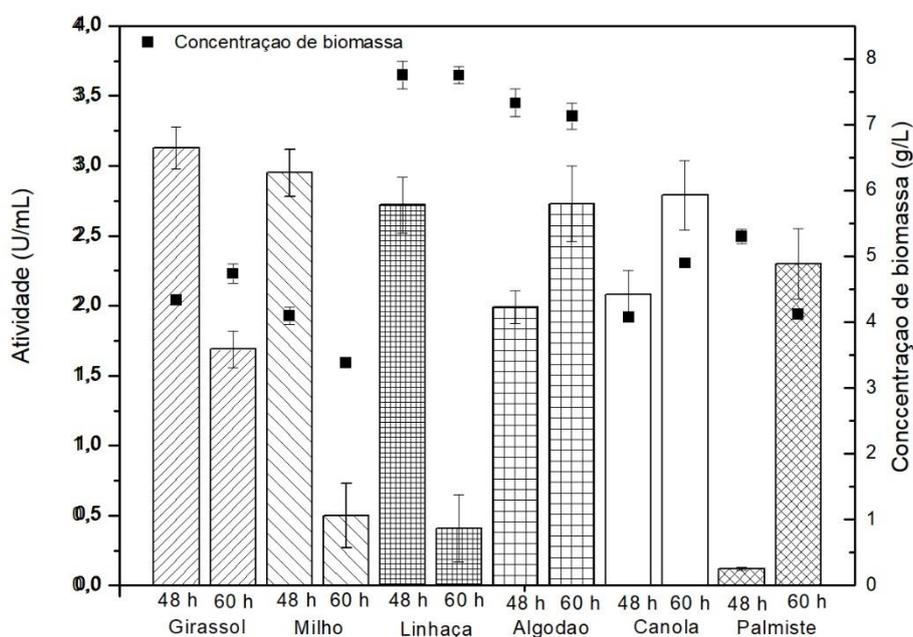


Figura 5 - Atividade hidrolítica e concentração de biomassa obtidas após 48 e 60 h de cultivo a 30 °C e 250 rpm de agitação, utilizando-se diferentes óleos vegetais.

O maior valor de atividade hidrolítica de  $3,13 \pm 0,15$  U/mL, produção específica 721,20 (U/g de biomassa) e produtividade em lipase de 70 U/(L.h) foi obtido para o óleo de girassol em 48 h de cultivo e o menor valor de atividade ( $0,12 \pm 0,01$  U/mL) para o óleo de palmiste em 48 h de cultivo. Em 48 h de cultivo também foram observados valores similares de atividade hidrolítica, de produção específica e de produtividade em lipase para o óleo de milho ( $2,95 \pm 0,17$  U/mL, 719,51 U/g de biomassa e 60 U/(L.h)). Para o óleo de linhaça a atividade hidrolítica ( $2,72 \pm 0,20$  U/mL) e a produtividade em lipase (60 U/(L.h)) foram similares aos valores encontrados para o óleos de milho e de girassol, mas a atividade específica foi menor (350,52 U/g de biomassa) em 48 horas de cultivo. Utilizando os óleos de algodão e de canola, também foram obtidas atividades hidrolíticas de  $2,73 \pm 0,48$  e  $2,79 \pm 0,73$  U/mL respectivamente, que estavam próximas às atividades encontradas para os óleos de girassol, milho e de linhaça. Entretanto, as produtividades em ambos foi menor (50 U/(L.h)), devido ao tempo de cultivo ter sido maior (60 h) e também foram encontrados menores valores de produção específica de 382,9 e 569,4 (U/g de biomassa) para os óleos de algodão e canola, respectivamente.

A maior concentração de biomassa foi obtida no meio de produção contendo óleo de linhaça em ambos os tempos de cultivo de 48 e 60 h ( $7,76 \pm 0,21$  g/L e  $7,75 \pm 0,13$  g/L, respectivamente). Nos meios contendo óleo de algodão também foi observado uma concentração de biomassa similar após 48 e 60 h de cultivo ( $7,33 \pm 0,21$ g/L e  $7,13$  g/L  $\pm 0,20$  g/L, respectivamente), diminuindo assim, os valores de produção específica encontrados, quando foram usados os óleos de algodão e linhaça como indutores e fonte de carbono no meio de produção.

Uma possível causa para os diferentes resultados observados para de lipases produzidas, concentração de biomassa e produção específica pode ser atribuída às diferenças encontradas na composição em ácidos graxos dos óleos vegetais utilizados no meio de produção (Tabela 3).

Nos óleos de girassol e de milho, o ácido linoleico (C18:2) corresponde à cerca de 70 e 59,8 % de suas composições, respectivamente. Assim, uma vez que os valores de atividade, produção específica e produtividade encontrados para esses óleos vegetais foi muito próximo, pode-se inferir que os óleos vegetais que continham maiores quantidades de ácidos graxos com dupla insaturação foram mais efetivos para indução da produção de lipases por *P. africana*.

A influência da composição de ácidos graxos no meio de cultivo como fonte de carbono ou indutores para a produção de lipases é relatada na literatura. Shimada *et al.* (1992) reportaram que a produção de lipases por *Geotrichum candidum*, era fortemente influenciada pelo tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo utilizado e também pelo número de suas insaturações. Ainda, o tipo de óleo indutor utilizado era capaz de controlar o nível de transcrição genética, fazendo com que o fungo pudesse produzir majoritariamente apenas uma de suas duas lipases.

Azeredo *et al.* (2007) reportaram que a produção de lipases pelo fungo *Penicillium restrictum*, via cultivo submerso, foi fortemente afetada devido ao tipo de fonte de carbono utilizada, sendo o óleo de oliva a melhor fonte de carbono e indutor de lipases (12,1 U/mL). Lakshmi *et al.* (1999) avaliaram o efeito de seis diferentes óleos vegetais refinados, amendoim, gergelim, mamona, palma, coco e girassol, na produção de lipases por *Candida rugosa* (DSM 2031). Os autores observaram que a produção de lipases aumentou conforme se aumentava a porcentagem total de insaturações nas cadeias de 18 carbonos (C18:n) dos ácidos graxos presentes no óleo vegetal. A máxima atividade lipolítica ao final de 48 h foi obtida para o óleo de gergelim (4,43 U/mL).

Com base nos resultados obtidos nessa etapa, o óleo de girassol foi selecionado para a realização das etapas seguintes deste trabalho, uma vez que foi o óleo que apresentou a melhor resposta para todos os parâmetros avaliados na produção de lipases (atividade hidrolítica, produção específica e produtividade)

## 5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE ALTERANDO A RELAÇÃO C/N

Diferentes relações de Carbono/Nitrogênio (C/N) no meio de produção podem afetar a rota metabólica do micro-organismo e, conseqüentemente, a produção de lipases (FREIRE *et al.*, 1997; GOMBERT *et al.*, 1999; RAO *et al.*, 1993). Assim, esse parâmetro também foi avaliado no presente trabalho, sendo utilizadas duas relações de C/N (8,63 e 7,05) inferiores à original (11,73) para o meio de cultivo contendo o óleo de girassol como indutor e fonte de carbono.

Os resultados obtidos para cada relação C/N nos tempos de 48 e 60 h, bem como a comparação com a C/N original estão representados na Figura 6.

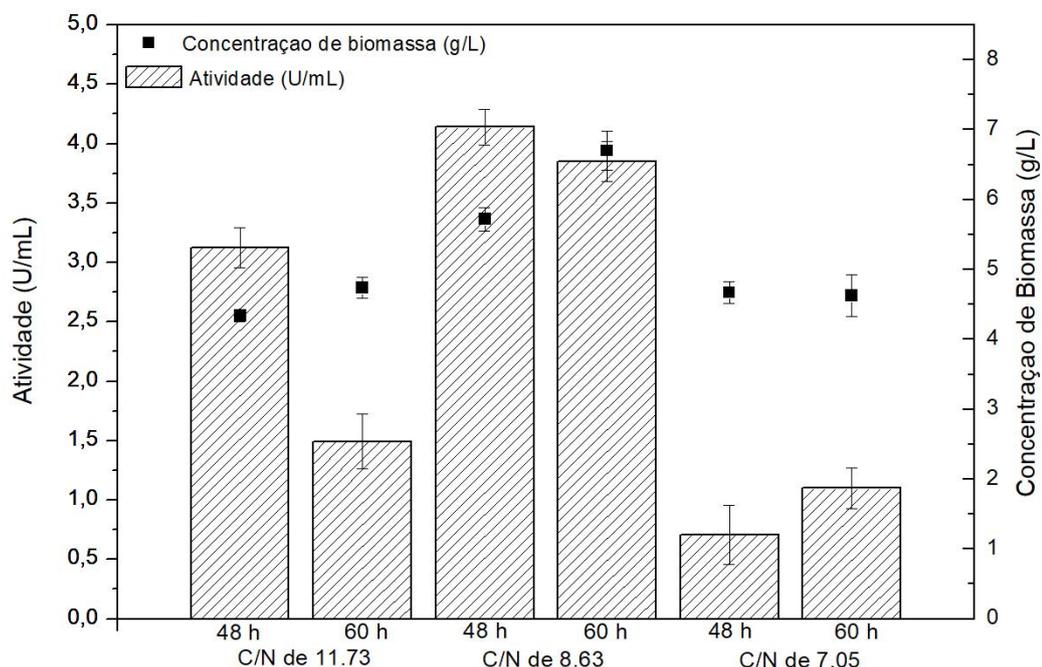


Figura 6 - Atividade hidrolítica (U/mL) e concentração de biomassa (g/L) obtidas em 48 e 60 h dos cultivos à 30 °C e 250 rpm para diferentes relações C/N, utilizando-se óleo de girassol como indutor e fonte de carbono

A maior atividade hidrolítica foi observada para a relação C/N 8,63 no tempo de 48 h ( $4,14 \pm 0,15$  U/mL) e a menor atividade foi observada para a relação C/N 7,05 após 48 h de cultivo ( $0,71 \pm 0,25$  U/mL). O valor de atividade encontrado para 48 h para a relação C/N de 8,63 foi superior ao valor obtido no ensaio anterior, quando foi usado uma C/N de 11,73 ( $3,13 \pm 0,15$  U/mL), demonstrando que a diminuição da relação C/N foi favorável à produção de lipases.

Esse resultado está de acordo com o descrito por Freire *et al.* (1997), que reportaram a produção de lipases extracelulares pelo fungo *Penicillium restrictum* via cultivo submerso. Os autores estudaram diferentes relações de C/N, tendo o óleo de oliva como fonte de carbono e indutor e observaram que para um intervalo de C/N entre 7,9 e 9,9 foi obtida a maior produção de lipases (15,0 U/mL). Os autores ainda observaram que quando uma C/N maior era utilizada, era desencadeada uma mudança metabólica no *Penicillium restrictum*, que favorecia um maior crescimento celular em detrimento da produção de lipase. Ainda, que maiores proporções do óleo de oliva no meio de cultivo

poderiam inibir a produção de lipases pelos ácidos graxos livres, mas ressaltaram que este mecanismo ainda não estava bem elucidado.

A relação de C/N de 7,05 proporcionou a menor produção de lipases dentre as razões analisadas, provavelmente porque a baixa concentração de óleo vegetal (0,5 %) (v/v), fez com que o micro-organismo tivesse menos estímulo para produzir lipases. Dessa forma, a relação C/N de 8,63 foi a escolhida para a realização do acompanhamento da produção com o tempo.

### 5.3 ACOMPANHAMENTO DA PRODUÇÃO DE LIPASE COM O TEMPO

O acompanhamento da produção de lipase durante 84 h por cultivo submerso foi realizado utilizando-se o óleo de girassol como indutor e fonte de carbono e a relação de C/N de 8,63. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 7.

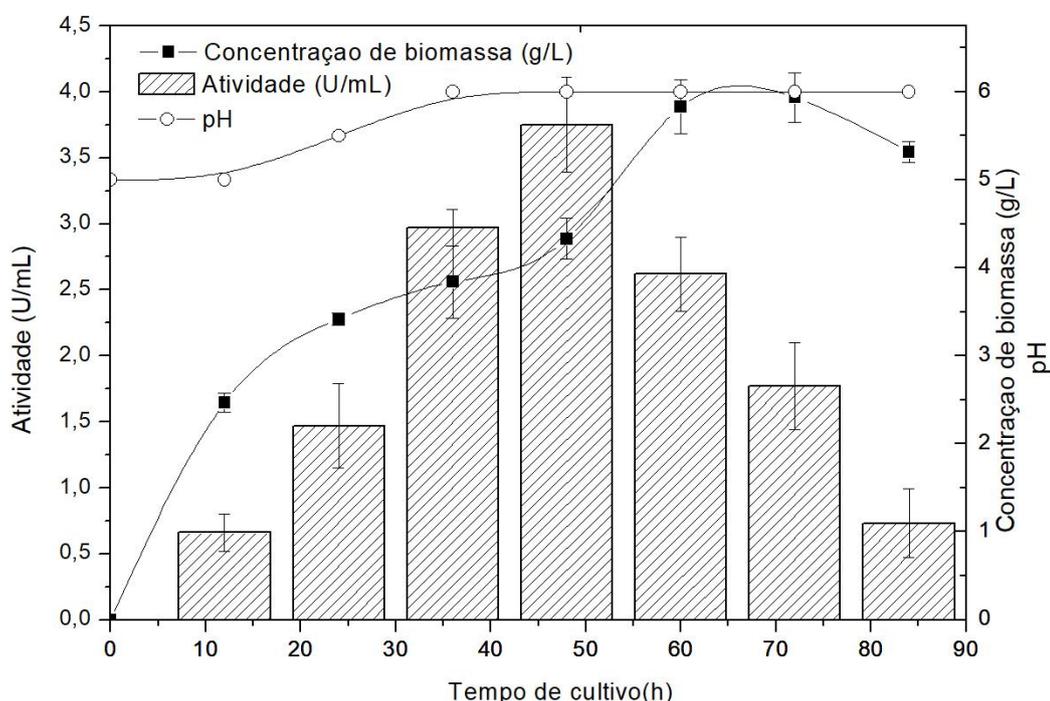


Figura 7 - Atividade hidrolítica, concentração de biomassa e pH do caldo ao longo de 84 h de cultivo à 30°C e 250 rpm, utilizando-se óleo de girassol como indutor e fonte de carbono e a relação de C/N de 8,63.

A produção de lipases por *P. africana* está associada ao metabolismo primário do fungo (SOUZA *et al.*, 2018). A maior produção de lipases foi obtida em 48 h de cultivo ( $3,75 \pm 0,36$  U/mL) e, após esse tempo, houve o decréscimo da produção de lipases no meio, provavelmente devido ao decréscimo da quantidade de óleo vegetal disponível no meio de produção ou de outro componente, já que a degradação da enzima produzida por proteases foi descartada, uma vez que a análise de eletroforese mostrou que o micro-organismo excretou apenas uma única proteína no caldo (ver item 5.4). Com relação à concentração de biomassa, o fungo atingiu a fase estacionária em 60 h de cultivo (em torno de  $5,83 \pm 0,31$  g/L). Após de 72 h iniciou-se a fase de morte celular, e também foi verificado um decréscimo acentuado da produção de lipases, provavelmente devido ao esgotamento de mais nutrientes do meio de produção. Não foi observada mudança significativa no valor do pH (5 a 6) no caldo de cultivo, durante o intervalo de tempo avaliado.

#### 5.4 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE PRODUZIDA

A lipase produzida foi precipitada em duas etapas, utilizando-se acetona como agente precipitante e, em seguida, foram determinadas as atividades específicas após cada etapa de precipitação e as amostras foram analisadas por eletroforese. O fator de purificação obtido foi em torno de 3,02% (em ambas etapas) e as atividades específicas foram de 341,8 e 306,6 (U/(mL.g) de proteína) para a 1ª e 2ª etapas de precipitação respectivamente. A análise de eletroforese confirmou que o caldo sintético de produção se utilizando o óleo de girassol como indutor e fonte de carbono, com relação C/N de 8,63 favoreceu a expressão de somente uma lipase produzida por *P. africana* (Figura 8).

No trabalho de Souza *et al.* (2018), a eletroforese do extrato bruto enzimático mostrou que havia mais bandas de proteínas presentes no caldo de fermentação após um tempo de cultivo de 48 horas, sendo que os autores conseguiram purificar e isolar apenas uma das proteínas presentes, que foi produzida majoritariamente, com massa molar aparente de 64 kDa.

No presente trabalho outra lipase de menor massa molar aparente (14,4 kDa) foi produzida majoritariamente e isolada do meio de cultivo após 48 h, sendo este o primeiro trabalho a reportar essa lipase produzida pelo fungo endofítico *P. africana*. Embora não seja tão comum, há relatos de lipases de baixa massa molar na literatura. Dartois *et al.* (1992) reportaram que a lipase extracelular de *Bacillus subtilis* 168 possui uma massa

molar aparente de 19,3 kDa. Castro-Ochoa *et al.* (2005) relataram a caracterização de uma lipase obtida de *Bacillus thermoleovorans* que possuía uma massa molar aparente de 11 kDa.

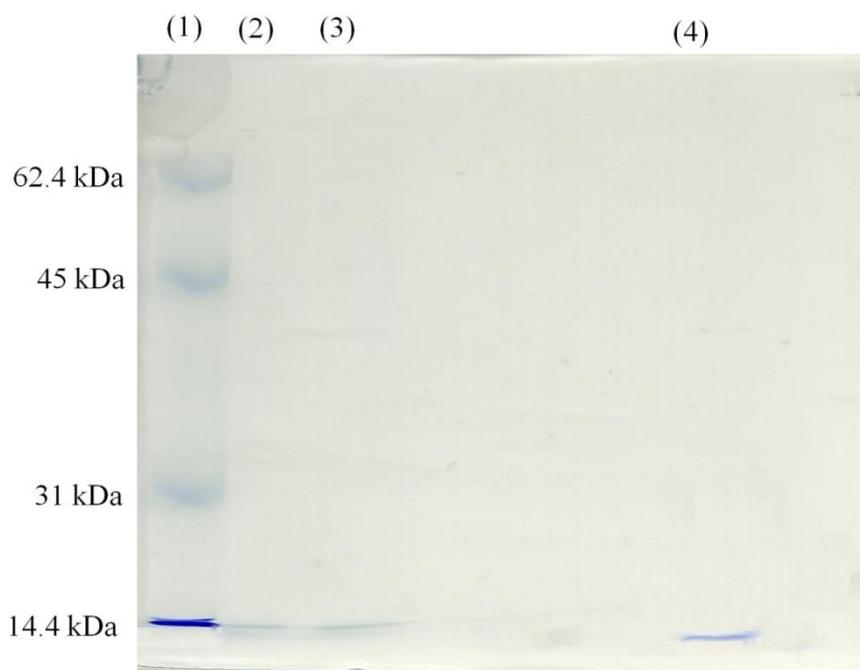


Figura 8 - SDS-Page, para a lipase de *P. africana* após 48 h de cultivo, utilizando o óleo de girassol como fonte de carbono e indutor e a relação de C/N de 8,63. Linhas: (1) Marcadores moleculares (2) Primeira etapa de precipitação (3) Segunda etapa de precipitação (4) Extrato bruto enzimático.

## 5.5 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E PH ÓTIMOS

A lipase produzida e purificada foi caracterizada quanto a temperatura e pH ótimos utilizando-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis independentes. Os resultados obtidos no planejamento fatorial encontram-se na Tabela 6.

Os melhores valores de atividade (29,58 e 29,37 U/mL) foram obtidos nos ensaios 1 e 2 da matriz do DCCR, com o pH 5,0 para ambos, demonstrando que a variação da temperatura entre 25,0 e 49,0 °C não influenciou a atividade da lipase produzida. O menor valor de atividade (16,00 U/mL) foi encontrado no ensaio 8, a pH 10,0 e temperatura de 37 °C.

Tabela 6 – Matriz do DCCR 2<sup>2</sup> para a determinação da temperatura e pH ótimos, utilizando-se a lipase purificada, produzida pelo *P. africana*. A variável reposta do planejamento foi a atividade hidrolítica obtida nos ensaios.

Ensaio	Variáveis Independentes		Respostas		
	Temperatura (°C)	pH	Atividade hidrolítica (U/mL)	Valor predito (%)	Desvio (%)
1	-1 (25,0)	-1 (5,0)	29,58	26,53	10,31
2	+1 (49,0)	-1 (5,0)	29,37	26,53	9,67
3	-1 (25,0)	+1 (9,1)	18,02	19,45	-7,94
4	+1 (49,0)	+1 (9,1)	20,18	19,45	3,62
5	-1,41 (20,0)	0 (7,0)	26,33	26,02	1,18
6	+1,41 (54,0)	0 (7,0)	27,00	26,02	3,63
7	0 (37,0)	-1,41 (4,0)	21,33	24,99	-17,15
8	0 (37,0)	+1,41 (10,0)	16,00	15,00	6,22
9	0 (37,0)	0 (7,0)	24,57	26,02	-5,90
10	0 (37,0)	0 (7,0)	25,00	26,02	-4,08
11	0 (37,0)	0 (7,0)	24,60	26,02	-5,77

A análise estatística mostrou que apenas os termos linear e quadrático para o pH ( $x_2$ ) foram estatisticamente significativos ao nível de 5% de significância, ou seja,  $p < 0,05$  (Tabela 7). O diagrama de Pareto (Fig. 9) mostra as variáveis que foram estatisticamente significativas no planejamento realizado.

Assim, os termos não significativos foram retirados do modelo e lançados nos resíduos e os coeficientes de regressão foram novamente recalculados e utilizados para gerar a Eq. (2).

Tabela 7 – Coeficientes de regressão obtidos para DCCR 2<sup>2</sup>, utilizando-se 5% de nível de significância.

	Coeficientes	Erro Padrão	p-valor
Média	24.72	1.35	0.0000
$x_1$	0.36	0.83	0.6795
$x_1^2$	1.38	0.98	0.2206
$x_2$	-3.54	0.83	0.0079
$x_2^2$	-2.62	0.98	0.0445
$x_1.x_2$	0.59	1.17	0.6338

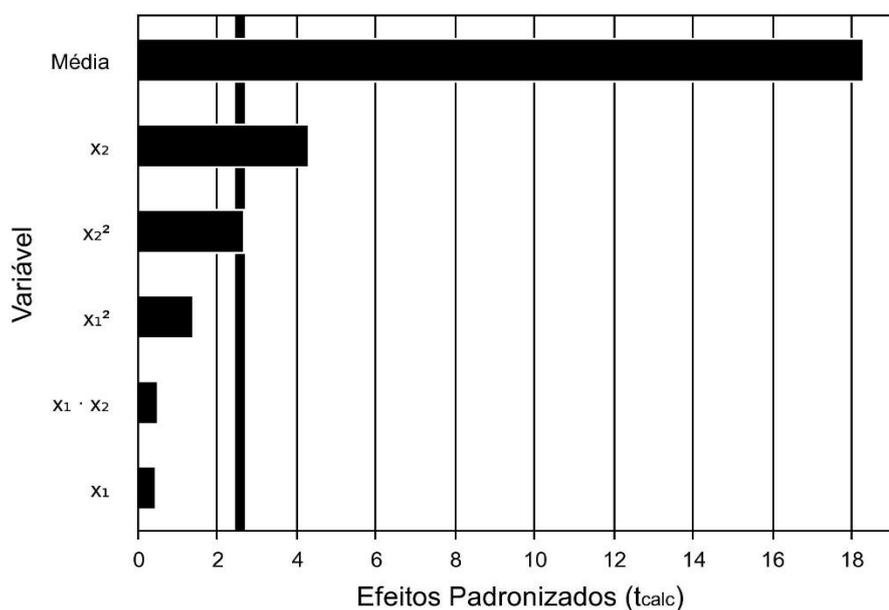


Figura 09 - Gráfico de Pareto para o DCCR 2<sup>2</sup> executado para a determinação da temperatura e pH ótimos, utilizando-se a lipase purificada, produzida pelo *P. africana*

$$Atividade \left( \frac{U}{mL} \right) = 26,02 - 3,54 x_2 - 3,03 x_2^2 \quad Eq (2)$$

A ANOVA, gerada somente para coeficientes estatisticamente significativos, está mostrada na Tabela 8. Verificou-se que  $F_{calc}$  (15,5) foi maior do que  $F_{tab}$  (4,46) e que o coeficiente de determinação foi satisfatório (0,80). Verificou-se que o valor do erro puro obtido foi baixo (0,1), indicando que os ensaios são reprodutíveis e os experimentos estão sob controle e sendo assim, a maior porcentagem dos resíduos observados se deveu a falta de ajuste do modelo aos dados experimentais. Entretanto, conforme discutido anteriormente, o coeficiente de determinação obtido foi satisfatório, pois a maioria dos valores previstos possui desvios abaixo de 10% (ver Tabela 6) permitindo a construção da superfície de resposta (Fig. 10) para análise das variáveis estudadas.

Tabela 8 - ANOVA para o DCCR 2<sup>2</sup> utilizando-se apenas os coeficientes de regressão estatisticamente significativos a 5% de nível de significância.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
Regressão	156,7	2	78,4	15,5	0,00178
Resíduos	40,5	8	5,1		
Falta de ajuste	40,4		6,7		
Erro puro	0,1		0,1		
Total	197,2	10			

$R^2 = 0,80$ ;  $F_{Tab\ 2;8;0,05} = 4,46$

Como nenhum termo da temperatura foi significativo a 5% de significância, a superfície de resposta gerada (Fig. 10) restringiu-se a apenas dois eixos, pH e atividade hidrolítica (U/mL). Observou-se que a lipase produzida apresentou valores próximos de atividade para a faixa de pH que vai de 5 a 7, e que com o aumento dos valores de pH a atividade da lipase produzida tende a diminuir.

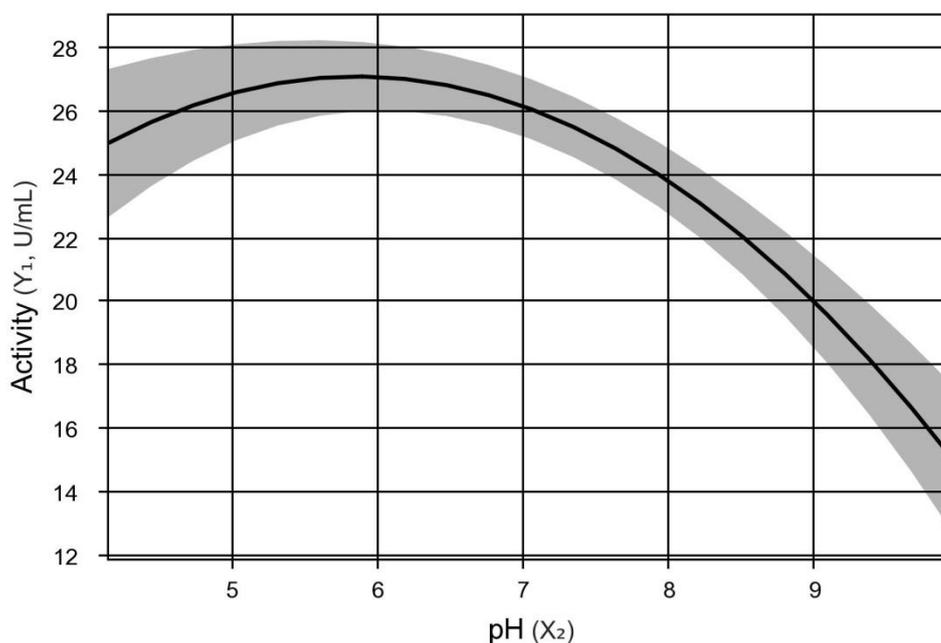


Figura 10 - Superfície de resposta mostrando a variação da atividade enzimática da lipase purificada, produzida pelo *P. africana* em função da variação do pH.

A variação da temperatura no intervalo estudado (de 20 a 54 °C) não foi estatisticamente significativa, ou seja, não influenciou nas atividades encontradas. Este é um aspecto positivo, pois significa que a lipase poderá ser utilizada em reações nas quais a temperatura da reação esteja acima da ambiente. A utilização de uma temperatura de operação mais alta traz vantagens, pois proporciona uma taxa de difusão mais alta, aumenta a solubilidade de lipídeos e outros substratos hidrofóbicos em água, diminui a viscosidade do substrato, aumenta a taxa de reação e diminui o risco de contaminação microbiana (HASAN *et al.*, 2006).

Para a validação do DCCR foi selecionada a condição do ensaio 1, na qual a temperatura era de 25°C e o pH 5,0. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo obtido uma atividade hidrolítica de  $28,12 \pm 1,75$  (U/mL).

## 6 CONCLUSÕES

A manipulação da fonte de carbono e indutor e da razão de C/N para o meio de produção possibilitou a produção de uma única lipase extracelular após 48 h de cultivo submerso pelo fungo endofítico *P. africana*. A proteína produzida foi confirmada por análise de eletroforese (14,4 KDa) e sua habilidade em expressar atividade utilizando o óleo de oliva como substrato (análise de atividade) demonstrou que se trata de uma lipase verdadeira.

A produção induzida de uma única lipase auxilia na diminuição das etapas de separação e purificação, que são as etapas responsáveis por elevar o custo do processo de produção industrial de uma enzima. Assim, o presente estudo utilizou-se uma técnica simples e proporcionou a produção majoritária de uma enzima por cultivo submerso, facilitando e barateando o seu processo de purificação, simplesmente estudando-se a relação da fonte de carbono/nitrogênio e o tipo de indutor no meio de produção.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para próximos trabalhos, sugere-se aprofundar na caracterização da lipase produzida, estudando-se a cinética enzimática, a estabilidade da enzima encubada em diferentes temperaturas e a estrutura proteica da mesma. Sugere-se também, que sejam realizados estudos para verificação de possíveis aplicações da lipase, em sua forma livre, e de sua especificidade frente a diferentes substratos. A imobilização para a lipase produzida, utilizando-se diferentes metodologias de imobilização, tais como adsorção por ligação covalente em diferentes suportes, formação de agregados enzimáticos (CLEAs), encapsulação, dentre outros, bem como as possíveis aplicações dos derivados obtidos em reações de esterificação é também um estudo interessante, que poderia ser desenvolvido.

## REFERÊNCIAS

- ADELEKE, B. S.; BABALOLA, O. O. Pharmacological potential of fungal endophytes associated with medicinal plants: A review. **Journal of Fungi**, África do Sul, v. 7, n. 2, p. 1–16, 2021.
- ADHIKARI, Priyanka; PANDEY, Anita. Phosphate solubilization potential of endophytic fungi isolated from *Taxus wallichiana* Zucc. roots. **Rhizosphere**, [S.l.], v. 9, p. 2-9, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.11.002>.
- ALI, R. *et al.* *Aspergillus awamori* ameliorates the physicochemical characteristics and mineral profile of mung bean under salt stress. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, Coreia do Sul, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2021.
- AMIRITA, A. *et al.* Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. **World J Sci Technol**, Índia, v. 2, n. 2, p. 13-19, 2012.
- AMOBONYE, A. *et al.* Biotechnological potential of *Beauveria bassiana* as a source of novel biocatalysts and metabolites. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 40, n. 7, p. 1019–1034, 2020.
- ARENAL, F.; PLATAS, G.; PELÁEZ, F. Two new *Preussia* species defined based on morphological and molecular evidence. **Fungal Diversity**, [S. l.], v. 20, p. 1–15, 2005.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, Arizona, v. 21, n. 2–3, p. 51–66, 2007.
- AYOB, F. W.; SIMARANI, K. Endophytic filamentous fungi from a *Catharanthus roseus*: Identification and its hydrolytic enzymes. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Malásia, v. 24, n. 3, p. 273–278, 2016.
- BACCIOTTI, Fernanda. **Fisiologia e formação de partículas lipídicas durante o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682**. 2015. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- BEZERRA, J. D. P. *et al.* Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill.(Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 28, n. 5, p. 1989-1995, 2012.
- BRADFORD, N. A. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of a protein isolated from red cell membranes. **Anal. Biochem**, Georgia, v. 72, n. 248, p. e254, 1976.
- BRUM, M. C. *et al.* Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. ('Niagara Rosada') and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. **Genetics and molecular research**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 4187–4197, 2012.

BURKERT, Janaina Fernandes de Medeiros *et al.* Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, [S. l], v. 80, n. 1, p. 61-67, 2005.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, [S. l], v. 27, p. 146-156, 2004.

CASTRO-OCHOA, Lelie D.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, Citlali; VALERIO-ALFARO, Gerardo; ROS, Rosamaría Oliart. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme And Microbial Technology**, [S.l], v. 37, n. 6, p. 648-654, nov. 2005.

CASTRO, P. F. *et al.* High Lipase Production from *Geotrichum candidum* in Reduced Time using Cottonseed Oil: Optimization, Easy Purification and Specificity Characterization. **Journal of Chemical Engineering Research Updates**, [S. l], v. 3, n. 2, p. 60–69, 2017.

CORTEZ, Daniela V.; CASTRO, Heizir F. de; ANDRADE, Grazielle SS. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, [S. l], v. 40, p. 85-96, 2017.

DARTOIS, Véronique *et al.* Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, Bélgica, v. 1131, n. 3, p. 253-260, 1992.

ELIBOL, Murat; OZER, Dursun. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, [S. l], v. 36, n. 4, p. 325-329, 2000.

FERREIRA, Matheus M.; SANTIAGO, Fernanda L.B.; SILVA, Nádia A.G.Da; LUIZ, Jaine H.H.; FERNANDÉZ-LAFUENTE, Roberto; MENDES, Adriano A.; HIRATA, Daniela B.. Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 67, p. 55-63, abr. 2018.

FOUDA, A. H. *et al.* Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). **Annals of Agricultural Sciences**, [S. l], v. 60, n. 1, p. 95–104, 2015.

FREIRE, Denise M. *et al.* Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter. In: **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, Rio de Janeiro, p. 409-421, 1997.

GAO, Y.; BREUIL, C. Extracellular lipase production by a sapwood-staining fungus, *Ophiostoma piceae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Canadá, v. 11, n. 6, p. 638-642, 1995.

GIOIELLI, L. A. F. DE C. F. DA U. Óleos e Gorduras Vegetais: Composição e Tecnologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l], v. 5, n. 2, p. 211–232, 1996.

GOMBERT, Andreas K. *et al.* Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, [S. l], v. 35, n. 1-2, p. 85-90, 1999.

GUNATILAKA, A. A. L. A.A.L. Gunatilaka. Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity and implication of their occurrence. *J.Net.Prod.* 2006, 69: 509-526. **J. Nat. Prod.**, [S. l], v. 69, p. 509–526, 2006.

HASAN, Fariha; SHAH, Aamer Ali; HAMEED, Abdul. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial technology**, [S. l], v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HOUDE, Alain; KADEMI, Ali; LEBLANC, Danielle. Lipases and their industrial applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, [S. l], v. 118, n. 1, p. 155-170, 2004.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, [S. l], v. 53, n. 1, p. 315-351, 1999.

JAGANNATH, S. *et al.* Bioactive compounds guided diversity of endophytic fungi from *Baliospermum montanum* and their potential extracellular enzymes. **Analytical Biochemistry**, Índia, v. 614, n. November 2020, p. 114024, 2021.

KATOCH, Meenu *et al.* Phylogeny, antimicrobial, antioxidant and enzyme-producing potential of fungal endophytes found in *Viola odorata*. **Annals of Microbiology**, [S. l], v. 67, n. 8, p. 529-540, 2017.

KUMAR, S. Suresh; GUPTA, Rani. An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. **Process Biochemistry**, Índia, v. 43, n. 10, p. 1054-1060, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [S. l], v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970.

MAKAREVICIENE, V.; SENDZIKIENE, E.; GAIDE, I. Application of heterogeneous catalysis to biodiesel synthesis using microalgae oil. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, [S. l], v. 15, n. 5, 2021.

MAPPERSON, R. R. *et al.* The diversity and antimicrobial activity of preussia sp. Endophytes isolated from Australian dry rainforests. **Current Microbiology**, Austrália, v. 68, n. 1, p. 30–37, 2014.

MATTOO, A. J.; NONZOM, S. Endophytic fungi: understanding complex cross-talks. **Symbiosis**, [S. l], p. 1-28, 2021.

MESHARAM, Vineet *et al.* Production, purification and characterisation of a potential fibrinolytic protease from endophytic *Xylaria curta* by solid substrate fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, [S. l], v. 181, n. 4, p. 1496-1512, 2017.

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

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista processos químicos**, [S. l], v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MONTGOMERY, Lucy Maud. *Anne of Avonlea*. Simon and Schuster, [S. l], 1909.

MURPHY, D. J. Review: The biogenesis and functions of lipids bodies in animals, plants and microorganisms. **Prog. lipid res.**, [S. l], v. 40, p. 325-438, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger - Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

OBRADORS, N. *et al.* Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. **Biotechnology letters**, Espanha, v. 15, n. 4, p. 357-360, 1993.

OLIVEIRA, Anne Caroline Defranceschi; FERNANDES, Maria Luiza; MARIANO, André Bellin. Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, Curitiba-PR, v. 45, p. 1503-1511, 2014.

PATIL, M. G. *et al.* Extracellular Enzymatic Activities of Endophytic Fungi Isolated from Various Medicinal Plants. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, [S. l], v. 4, n. 3, p. 1035–1042, 2015.

POPA, V.-M. *et al.* Fatty acids composition and oil characteristics of linseed (*Linum Usitatissimum* L.) from Romania. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, [S. l], v. 18, n. 2, p. 136–140, 2012.

RAMOS, E. Z. *et al.* Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l], v. 118, 89 p. 43–51, 2015.

RAO, H. C. Y.; KAMALRAJ, S.; JAYABASKARAN, C. **Fascinating fungal endophytes associated with medicinal plants: Recent advances and beneficial applications**. [S.l] Elsevier Inc., 2019.

RAO, P. Venkata; JAYARAMAN, Kunthala; LAKSHMANAN, C. M. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation. 2: Medium optimization and effect of aeration. **Process Biochemistry**, [S. l], v. 28, n. 6, p. 391-395, 1993.

ROCHA, K. S. C. *et al.* Lipases of Endophytic Fungi *Stemphylium lycopersici* and *Sordaria* sp.: Application in the synthesis of solketal derived Monoacylglycerols. **Enzyme and Microbial Technology**, Rio de Janeiro, v. 142, n. September, 2020.

RODRIGUEZ, R. J. *et al.* Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. **New Phytologist**, [S. l], v. 182, n. 2, p. 314–330, 2009.

SHARMA, Rohit; CHISTI, Yusuf; BANERJEE, Uttam Chand. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology advances**, [S. l], v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SHEN, Yao-Qing; BURGER, Gertraud. Plasticity of a key metabolic pathway in fungi. **Functional & Integrative Genomics**, [S. l], v. 9, n. 2, p. 145-151, 16 set. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10142-008-0095-6>.

SILVEIRA, Erick A.; TARDIOLI, Paulo W.; FARINAS, Cristiane S.. Valorization of Palm Oil Industrial Waste as Feedstock for Lipase Production. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [S. l], v. 179, n. 4, p. 558-571, 18 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-016-2013-z>

SOARES, C.M.F.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. (1999). Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l], v. 77/79, p. 745-757.

SOPALUN, K.; IAMTHAM, S. Isolation and screening of extracellular enzymatic activity of endophytic fungi isolated from Thai orchids. **South African Journal of Botany**, [S. l], v. 134, p. 273–279, 2020.

SOUZA, I. *et al.* Isolation and Screening of Extracellular Lipase-Producing Endophytic Fungi from *Handroanthus impetiginosus*. **Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology**, [S. l], v. 4, n. 2, p. 1–10, 2018.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: A rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, [S. l], v. 18, n. 4, p. 448–459, 2001.

VÁZQUEZ-MONTOYA, E. L. *et al.* Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. **Revista Argentina de Microbiología**, [S. l], v. 52, n. 1, p. 4–12, 2020.

VERMA, Swati; MEGHWANSHI, Gautam Kumar; KUMAR, Rajender. Structural homogeneity in microbial lipases. **Environments**, [S. l], v. 8, p. 738-48, 1998.

WANG, Yongxiang *et al.* Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841). **Journal of Fermentation and Bioengineering**, [S. l], v. 79, n. 5, p. 433-438, 1995.

YASSER, M. M. *et al.* Molecular Identification, Extracellular Enzyme Production and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Isolated from *Solanum tuberosum* L. in Egypt. **Biosciences, Biotechnology Research Asia**, [S. l], v. 16, n. 1, p. 135–142, 2019.

## APÊNDICE A – Exemplo de cálculo utilizado para Relação C/N

Tabela com a composição do meio

Componentes	Meio de Cultivo					
	Composição do Meio (para 1L) - <b>A</b>		% C (p/p) - <b>B</b>	% N (p/p) - <b>C</b>	Massa de C (mmol/L)	Massa de N (mmol/L)
Peptona de Caseína	20,00	g/L	60,00	12,00	1000,00	171,34
Extrato de Levedura	1,00	g/L	45,00	12,00	37,50	8,57
Nitrato de Sódio NaNO <sub>3</sub>	0,50	g/L	0,00	16,00	0,00	5,71
Sulfato de Magnésio heptahidratado MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,50	g/L	0,00	0,00	0,00	0,00
Nitrato de Cálcio tetra hidratado Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,50	g/L	0,00	6,00	0,00	2,14
Fosfato de sódio monobásico NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50	g/L	0,00	0,00	0,00	0,00
Cloreto de Cálcio CaCl <sub>2</sub>	0,50	g/L	0,00	0,00	0,00	0,00
Fonte de carbono (Óleo vegetal)	9,10	g/L	76,84	0,00	582,70	0,00
Total =					1620,20	187,76
Relação C/N =					8,63	

Valores de referência:

Peso Molecular (g/mol)		Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	
Carbono - <b>D</b>	12	Óleos vegetais	0,91
Nitrogênio - <b>E</b>	14,007		

Equações utilizadas:

$$\text{Massa de C } \left( \frac{\text{mmol}}{L} \right) = \left( \left( \frac{B}{100} \right) * A * \left( \frac{1}{D} \right) \right) * 1000$$

$$\text{Massa de N } \left( \frac{\text{mmol}}{L} \right) = \left( \left( \frac{C}{100} \right) * A * \left( \frac{1}{E} \right) \right) * 1000$$