



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

HELTON SANTANA DE OLIVEIRA

**EFLUENTE OLEOSO COMO ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO
DE LIPASE POR FUNGOS**

RECIFE
2020

HELTON SANTANA DE OLIVEIRA

**EFLUENTE OLEOSO COMO ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO
DE LIPASE POR FUNGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Aplicada

Orientadora: Prof^a. Dr^a Norma Buarque de Gusmão

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Luciana de Oliveira Franco

RECIFE
2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Oliveira, Helton Santana de
Efluente oleoso como alternativa para a produção de lipase por fungos / Helton
Santana de Oliveira – 2020.

59 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Norma Buarque de Gusmão
Coorientadora: Luciana de Oliveira Franco

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos,
2020.

Inclui referências.

1. Fungos 2. Lipase 3. Óleos e gorduras alimentícias I. Gusmão, Norma
Buarque de (orient.) II. Franco, Luciana de Oliveira (coorient.) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-041

HELTON SANTANA DE OLIVEIRA

**EFLUENTE OLEOSO COMO ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO DE LIPASE
POR FUNGOS EM CONSÓRCIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 18 de fevereiro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão (Orientadora)
Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Marcos Barbosa de Lima (Examinador Externo)
Departamento de Biologia – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^o. Dr. Bruno Severo Gomes (Examinador Externo)
Departamento de Micologia – Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a Deus, pois sem ele nada seria possível, aos meus pais, ao meu companheiro Jonathan Mendes e a toda minha família, por todo incentivo e apoio constante para que eu chegasse até aqui.

Agradecimentos

- Primeiramente, a Deus por me conceder a oportunidade de realizar este trabalho;
- Aos meus pais Erli e Simone e meus irmãos, que sempre me incentivaram mesmo nos momentos difíceis;
- Ao Jonathan Mendes pelo companheirismo, afeto, apoio e paciência;
- Aos meus familiares, avó, tios e primos, e aos meus amigos pela torcida;
- À orientadora Professora Dra. Norma Gusmão, que bem me recebeu no seu laboratório, agradeço por todos os ensinamentos, atenção e paciência;
- A minha co-orientadora Dra. Luciana Franco, a quem tanto estimo e que me acompanha desde a graduação, agradeço pelo valioso incentivo, paciência e apoio em todos os momentos;
- Aos colegas da turma, pelos momentos maravilhosos durante o curso. Em especial às minhas queridas amigas Evelyn e Katyene pelo incentivo, apoio e amizade;
- À todos meus amigos do LAMAI, do Departamento de Antibióticos/UFPE, pela convivência nestes últimos dois anos: Sarah, Hugo, Luana, Thales, Welma, Manuela, Vitória, Diana, Eduardo, etc.
- À Sarah, Harlan e Ivana e todos que me deram auxílio em alguma etapa desse trabalho.
- À Camilo e toda equipe do Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição, pelo suporte durante a análise centesimal.
- E a todos que de alguma maneira contribuíram para a concretização deste trabalho.

“Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida.”

Sócrates

RESUMO GERAL

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas pertencentes à classe das hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em triacilgliceróis insolúveis, liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Elas podem ser empregadas em diversos setores industriais. Os fungos são preferencialmente utilizados para a produção destas enzimas e vários resíduos industriais podem ser usados como substratos para a produção, o que além de ser vantajoso pelo baixo custo e grande disponibilidade destes materiais, ainda ajuda a solucionar os problemas ambientais que poderiam ser causados pelo descarte dos mesmos. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial de uso de efluente de lavagem de galões contendo óleo pós-fritura na produção de biomassa e de lipases por amostras de fungos filamentosos em consórcio. Para isso, foram utilizadas dez cepas fúngicas, crescidas em fermentação submersa, das quais as melhores produtoras de lipases foram combinadas em consórcios e realizado planejamento fatorial 2^3 , na tentativa de otimizar esta produção. Também foi realizada a fermentação em biorreator, estudo da cinética enzimática e teste de fitotoxicidade com o extrato bruto, assim como composição centesimal da biomassa produzida. *C. bertholletiae* (URM 7658) apresentou maior atividade lipolítica, com 0,591 U/ml, seguida por *C. echinulata* (URM 7660) e *Rhizopus microsporus* (URM 7652), com 0,5443 U/ml e 0,5276 U/ml, respectivamente. Dentre as variáveis testadas no planejamento fatorial, o pH demonstrou influência significativa na produção enzimática, enquanto a concentração de substrato e o volume de NH_4NO_3 não. A melhor temperatura para a reação foi 40°C e o melhor pH, 8. O extrato enzimático de *C. bertholletiae* se manteve estável em pH acima de 8 e quando incubado até 60 min. a 40°C. Apesar da atividade lipolítica apresentada pelos fungos não ter sido muito expressiva, quando comparada a outras pesquisas correlatas, o teste de fitotoxicidade com os líquidos metabólicos dos biorreatores revelou índices de germinação acima de 50%, revelando que foram capazes de diminuir consideravelmente a toxicidade do efluente bruto. Além disso, a biomassa gerada no processo fermentativo apresentou elevado teor energético, composta por 4% de proteínas, 6% de carboidratos, 21% de lipídeos, 68% de umidade e 0,7% de cinzas, o que seria equivalente a aproximadamente, 13% de proteínas, 19% de carboidratos, 66% de lipídeos e 2% de cinzas caso a biomassa estivesse seca, podendo encontrar aplicação como ingrediente de rações para animais.

Palavras-chave: Óleo pós fritura. água. tratamento de efluentes. extrato enzimático. cinética enzimática.

ABSTRACT

Lipases (EC 3.1.1.3) are enzymes belonging to the hydrolases class and act on ester bonds present in insoluble triacylglycerols, releasing free fatty acids, diacylglycerols, monoacylglycerols and glycerol. They can be used in several industrial sectors. Fungi are preferentially used for production and industrial residues used as substrates for the production of lipase, which in addition to being advantageous due to the low cost, great availability of this material, still helps to solve the environmental problems that could be caused by the disposal of the same. In view of this, the present study aimed to investigate the potential of washing gallons effluent containing post-frying oil in the production of lipase by fungi in consortium and to analyze the value of the residual biomass produced. For this purpose, ten fungal strains in submerged fermentation were used, of which the best producers were combined in consortia and performed a factorial planning 2^3 , in an attempt to increase production. Fermentation was also carried out in a bioreactor, study of enzymatic kinetics and phyto-toxicity test with the crude extract and chemical composition of the residual biomass. *C. bertholletiae* (URM 7658) showed greater lipolytic activity, with 0.591 U / ml, followed by *C. echinulata* (URM 7660) and *Rhizopus microsporus* (URM 7652), with 0.5443 U / ml and 0.5276 U / ml, respectively. In factorial design, pH showed a significant influence on enzyme production, while substrate concentration and NH_4NO_3 volume did not. The best reaction temperature obtained was 40°C and the best pH, 8. The enzymatic extract of *C. bertholletiae* remained stable at pH above 8 and when incubated up to 60 min. at 40°C. Although the lipolytic activity presented by the fungi was not very expressive, the photo-toxicity test with the metabolic liquids of the bioreactors revealed germination rates above 50%, revealing that they were able to significantly reduce the toxicity of the raw effluent. In addition, the biomass generated in the fermentation process had a high energy content, composed of 4% proteins, 6% carbohydrates, 21% lipids, 68% moisture and 0.7% ash, which would be equivalent to approximately, 13% of proteins, 19% of carbohydrates, 66% of lipids and 2% of ash if the biomass was dry, and it can find application as an ingredient in animal feed.

Key-words: Post-frying oil. water. wastewater treatment. enzymatic extract. enzymatic kinetics.

Lista de figuras

Figura 1 –	Atividade lipolítica específica produzida por 10 cepas fúngicas utilizando efluente de óleo pós fritura	41
Figura 2 –	Produção lipolítica pelos consórcios A, B, C e D, em função da concentração do efluente oleoso	43
Figura 3 –	Rendimentos da produção de lipase pelos consórcios C e D em cada ensaio do planejamento fatorial 2^3	45
Figura 4 –	Efeito das variáveis sobre a produção lipolítica pelos consórcios C e D	45
Figura 5 –	Produção enzimática pelos biorreatores A, B, C e D	47
Figura 6 –	Efeito do pH na atividade do extrato bruto de <i>C. bertholletiae</i>	48
Figura 7 –	Efeito da temperatura na atividade do extrato bruto de <i>C. bertholletiae</i>	48
Figura 8 –	Atividade enzimática relativa em função do tempo de incubação a 40° C	49
Figura 9 –	Atividade enzimática relativa em função da incubação a diferentes valores de Ph	49
Figura 10 –	Índice de germinação (IG%) das sementes de <i>Cucumis sativus</i> crescidas com o líquido metabólico dos biorreatores A, B, C e D	50
Figura 11 –	Composição centesimal da biomassa residual fúngica	51

Lista de quadros e tabelas

Tabela 1 –	Lista das cepas fúngicas estudadas	33
Quadro 1 –	Consórcios micobianos montados e sua respectiva composição	42
Quadro 2 –	Matriz do planejamento experimental completa com os resultados de produção enzimática obtidos em cada ensaio	44
Tabela 2 –	Composição centesimal da biomassa residual fúngica	51

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 ASPECTOS GERAIS DAS LIPASES.....	15
2.1.1 Classificação das Lipases	15
2.1.2 Estrutura e mecanismos catalíticos das Lipases	17
2.1.3 Propriedades das Lipases	19
2.1.3.1 Especificidade.....	19
2.1.3.2 Estabilidade.....	20
2.1.4 Importância e aplicações das Lipases	21
2.1.5 Fontes de Lipase	23
2.1.5.1 Fontes animais.....	23
2.1.5.2 Fontes vegetais.....	24
2.1.5.3 Fontes microbianas.....	25
2.1.5.3.1 <i>Bactérias</i>	25
2.1.5.3.2 <i>Fungos</i>	26
2.2 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASE POR FUNGOS.....	27
2.2.1 Obtenção do inóculo	27
2.2.2 Processo fermentativo	28
2.2.3 Composição do meio fermentativo	29
2.2.4 Resíduos industriais na produção de Lipase	30
2.2.5 Otimização da produção de Lipase	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 EFLUENTE.....	33
4.2 FUNGOS FILAMENTOSOS.....	33
4.3 PRODUÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	33
4.4 DETECÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA.....	34
4.5 TESTE DE ANTAGONISMO MICROBIANO.....	34
4.6 PRODUÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO POR CONSÓRCIOS FÚNGICOS.....	35
4.7 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR.....	35

4.8 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM BIORREATOR.....	35
4.9 CINÉTICA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	36
4.9.1 Determinação das melhores temperaturas e pH para reação.....	36
4.9.2 Determinação da estabilidade térmica.....	36
4.9.3 Estabilidade em diferentes valores de pH.....	36
4.10 TOXICIDADE DE SUBPRODUTOS FORMADOS.....	36
4.11 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE BIOMASSA FÚNGICA RESIDUAL.....	37
4.11.1 Obtenção da Biomassa.....	37
4.11.2 Determinação da umidade e substancias voláteis.....	37
4.11.3 Determinação do resíduo seco.....	38
4.11.4 Determinação do resíduo incinerado – Cinzas.....	38
4.11.5 Determinação de Lipídios – Extração direta em Soxhlet.....	38
4.11.6 Determinação de Proteína – Método de Kjeldahl.....	39
4.11.7 Determinação de Carboidratos e fibras.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 PRODUÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	41
5.2 TESTE DE ANTAGONISMO MICROBIANO.....	42
5.3 PRODUÇÃO DE LIPASE PELOS CONSÓRCIOS.....	43
5.4 DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	44
5.5 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM BIORREATOR.....	46
5.6 CINÉTICA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	47
5.7 TOXICIDADE DE SUBPRODUTOS FORMADOS.....	50
5.8 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE BIOMASSA FÚNGICA RESIDUAL.....	50
6 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas pertencentes à classe das hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em triacilgliceróis insolúveis, liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Além da hidrólise de triglicerídeos, as lipases podem catalisar uma variedade de reações químicas que incluem esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade. Sendo muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disso, não requerem cofatores, atuam em uma ampla faixa de pH, geralmente de 4 a 11, são muito estáveis, apresentam especificidade e exibem propriedades de transformação seletivas (regiosseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade) (Piscitelli *et al.*, 2017; Geoffry e Achur, 2018).

As lipases têm sido extensivamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e, mais recentemente, para aplicações industriais. Elas podem ser empregadas em diversos setores industriais (alimentos, cosméticos, detergentes, couro, produtos farmacêuticos), como também na biomedicina e na biorremediação de ambientes poluídos com derramamentos contendo hidrocarbonetos, resíduos da fabricação de óleo ou processamento de alimentos (óleos vegetais ou gordura animal de resíduos domésticos ou restaurantes) (Rihani *et al.*, 2018).

Apesar de também serem produzidas por várias plantas e animais, as lipases microbianas ganharam especial atenção industrial devido à sua capacidade funcional sob condições extremas de temperatura, pH e estabilidade em solventes orgânicos, quimiosseletividade, regiosseletividade e enantiosseletividade. Além disso, os micro-organismos apresentam maior facilidade de manipulação genética e rápido crescimento em meios baratos que permitem uma produção enzimática mais adequada e rentável, podendo inclusive produzir lipases a partir de rejeitos de outros processos industriais (Mehta *et al.*, 2017).

Entre as fontes microbianas, os fungos ganham preferência para uso comercial, pois geralmente produzem lipases extracelulares, facilitando o processo de extração do meio de cultura e de purificação, além de serem considerados micro-organismos seguros para a manipulação. As lipases fúngicas também são consideradas proeminentes para aplicação industrial devido à sua melhor estabilidade e por possuírem propriedades mais

diversificadas e ampla especificidade de substrato (Geoffry e Achur, 2018; Rihani *et al.*, 2018).

Tanto as leveduras quanto os fungos filamentosos são produtores de lipases, como a *Candida cylindracea*, *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium citrinum* e *Aspergillus ibericus*, e podem ser isolados a partir de diversas fontes, como resíduos industriais e domésticos oleosos e ou gordurosos, solos contaminados com óleos e graxas, plantas e animais vivos ou mortos e sementes oleaginosas. Apesar do grande avanço nos últimos tempos, pesquisas para isolar e selecionar novas linhagens de fungos lipolíticos, bem como a procura por fontes alternativas de carbono e processos de fermentação com menos custos continuam crescendo uma vez que se buscam enzimas com características catalíticas cada vez mais específicas e adequadas aos processos industriais e com menores custos de produção (Roveda, 2010; Abrunhosa *et al.*, 2013; Jesus *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2016; Marotti *et al.*, 2017).

Durante o processo de produção de lipase fúngica, os cultivos em meio líquido têm apresentado vantagens sobre os semissólidos ou sólidos, pois possibilitam melhor eficácia nos processos de extração. A utilização de meios de culturas constituídos de resíduos industriais também tem representado um recurso potencial nos processos biotecnológicos principalmente devido ao seu baixo custo, disponibilidade e composições com nutrientes que contenham carbono, nitrogênio e micronutrientes essenciais (Cai *et al.*, 2017).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial de água de lavagem de galões contendo óleo pós-fritura na produção de lipase por fungos e analisar o valor da biomassa residual produzida.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ASPECTOS GERAIS DAS LIPASES

As lipases (acil-hidrolases de triacilglicerol, EC 3.1.1.3) são enzimas que pertencem à classe das hidrolases e, sobre uma interface óleo-água, atuam em ligações éster de ácido carboxílico, muitas vezes sem necessitar de cofator (Wadia e Jain, 2017).

Essas enzimas catalisam uma ampla gama de reações conhecidas como reações de bioconversão. Sua função biológica primordial é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com comprimentos de cadeia de ácidos graxos superiores a C10, em diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos livres (Kiran *et al.*, 2016; Abdelmoez *et al.*, 2013). Contudo, em condições em que a disponibilidade de água no meio é reduzida ou ausente, essas biomoléculas são capazes de catalisar reações inversas, a esterificação, que envolve a formação de triacilgliceróis, diacilgliceróis ou monoacilgliceróis a partir da síntese de ésteres de ácidos graxos e glicerol. Nessas condições também podem ocorrer uma série de reações de transesterificação. O termo transesterificação refere-se à troca de grupos entre um éster e outros compostos orgânicos. Dependendo do substrato e da especificidade da lipase a ele, pode ocorrer reação de acidólise, na qual ocorre a transferência do grupamento acila entre um acilglicerol e um ácido carboxílico, reação de alcoólise, na qual o grupamento acila é transferido entre um acilglicerol e um álcool, reação de aminólise, na qual o grupamento acila é transferido entre um acilglicerol e uma amina. Os processos de hidrólise e esterificação podem ainda ser combinados em uma sequência lógica resultando em reações denominadas interesterificações, na reação de glicerólise, por exemplo, ocorre a interesterificação do triacilglicerol com glicerol. O equilíbrio dessas reações no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese) é controlado pela atividade de água (a_w) do meio reacional (Borrelli e Trono, 2015; Nascimento *et al.*, 2014; Cortez *et al.*, 2017).

2.1.1 CLASSIFICAÇÃO DAS LIPASES

Segundo o tipo de reações que catalisam, as enzimas são classificadas em seis categorias principais com diferentes números de comissão enzimática (E.C.). A nomenclatura e a atribuição do número de EC são descritas nas diretrizes estabelecidas pela *International Union of Biochemistry* e se baseiam no mecanismo de ação da enzima. As Oxirredutases (EC1) catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja: reações de

óxidoreduções, as Transferases (EC2) catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc, de uma molécula para outra, as Hidrolases (EC3) catalisam reações de hidrólise de ligação covalente, as Liasas (EC4) catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de amônia e gás carbônico, as Isomerases (EC5) catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos, e as Ligases (EC6) catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes. Todas as enzimas conhecidas se enquadram em uma dessas categorias (Kiran *et al.*, 2016; Orlandelli *et al.*, 2012).

A classe das hidrolases inclui uma superfamília chamada α/β -hidrolases, a qual pertence as enzimas lipolíticas (Gopinath *et al.*, 2013; Pandey *et al.*, 2015).

Existem dois grupos de enzimas lipolíticas, estreitamente relacionadas, que atuam em ligações éster de ácido carboxílico, as Lipases (EC3.1.1.3) e as Carboxilesterase (EC3.1.1.1). As lipases diferem das carboxilesterase em termos do fenômeno de ativação interfacial, ou seja, sua capacidade em atuar numa interface lipídio-água, conseqüentemente, elas também diferem em seus perfis de substratos, pois enquanto as lipases catalisam a hidrólise de ésteres insolúveis em água com ácidos graxos de cadeia longa (≥ 10 átomos de carbono), as carboxilesterases são mais ativas para ésteres solúveis em água com cadeias de ácidos graxos relativamente curtos (< 10 átomos de carbono). (Shao *et al.*, 2014; Ramos-Sánchez *et al.*, 2015; Sperb *et al.*, 2015).

A classificação dentro das lipases foi primeiramente apresentada para as produzidas por bactérias, com base na topologia da proteína, considerando a alta diversidade de sequência dessas enzimas. Em 1999, Arpigny e Jaeger classificaram as enzimas lipolíticas bacterianas em oito famílias (I a VIII), das quais seis possuem dobras características de α/β -hidrolases, enquanto II e VIII, consistem em dobras de SGNH-hidrolase e β -lactamase, respectivamente. Esta classificação foi revisada várias vezes e atualmente existem quinze famílias que fazem parte do banco de dados da ESTHER, disponível em <http://bio-web.ensam.inra.fr/esther>. O ESTHER é um banco de dados amplo, com informações sobre uma grande diversidade de superfamílias de α/β -hidrolases, incluindo lipases (Borrelli e Trono, 2015).

Além da classificação de Arpigny e Jaeger (1999), uma nova classificação foi relatada mais recentemente no *Lipase Engineering Database* (LED), disponível em <http://www.led.uni-stuttgart.de>, incluindo não apenas lipases bacterianas, mas também de leveduras, fungos filamentosos e mamíferos. O LED integra informações sobre sequência e estrutura de lipases e proteínas relacionadas, compartilhando as mesmas dobras de α/β -

hidrolases, para facilitar a engenharia de proteínas. Além disso, ele fornecer links para as estruturas de lipase publicadas, servindo como uma ferramenta de bioinformática para análise sistemática da relação de sequência, estrutura e função de diversas proteínas lipase e para projetar variantes com propriedades otimizadas (Gupta *et al.*, 2015).

Com base principalmente no buraco do oxiânion, o LED classifica as lipases em três classes diferentes: GX, GGGX e Y e as divide em superfamílias com base no pentapeptídeo conservado. A classe GGGX é subdividida em seis superfamílias que inclui quatro superfamílias de lipases, abH02 – Lipase de *Yarrowia lipolytica*, abH03 – Lipase de *Candida rugosa*, abH04 – Lipase de *Moraxella 2* e abH05 - Lipases sensíveis à hormônio, que possuem como pentapeptídeos conservados, GHSLG, GESAG, GDSAG e GASAG, respectivamente. As outras duas superfamílias dessa classe são esterases. A classe GX consiste em 27 superfamílias que incluem apenas 10 superfamílias de lipases, abH23 - Lipases de fungos filamentosos, abH07 – Lipase de *Moraxella 3*, abH18 - Lipases de *Bacillus*, abH15 - Lipases de *Burkholderia*, abH37 – Lipases de *Candida antarctica*, abH24 - Lipases de *Pseudomonas*, abH14 - Lipase gástrica, abH20 - Lipases lipoproteicas, abH25 - Lipase de *Moraxella 1*, abH22 – Lisofosfolipase, abH16 - Lipases de *Streptomyces*, tendo como pentapeptídeos conservados GNSMG, GHSMG, AHSMG, GHSHG, TWSQG, GHSLG, GHSQG, GYSLG, GWSMG, GFSQG e GHSQG, respectivamente. As superfamílias restantes dessa classe contêm proteínas semelhantes a lipase. A classe Y consiste de 5 superfamílias com apenas uma superfamília de lipase, abH38 – Lipase de *Candida antarctica*, com GASHG como pentapeptídeo conservado. Com base nesta classificação e nas semelhanças de sequência de aminoácidos, as lipases fúngicas ocorrem em cinco superfamílias diferentes, duas na classe GX, duas na classe GGGX e uma na classe Y (Mehta *et al.*, 2017; Gupta *et al.*, 2015).

2.1.2 ESTRUTURA E MECANISMOS CATALÍTICOS DAS LIPASES

Embora se diferenciem em função do tamanho e do número de aminoácidos da sequência primária, todas as lipases apresentam padrões de dobramento estrutural muito semelhante, do tipo α/β -hidrolases, comum também a outras hidrolases, como esterases, proteases, peroxidases, entre outras. Nesse modelo estrutural uma folha central plissada por β contém oito cadeias β , principalmente paralelas, conectadas em ambos os lados por porções em α -hélices. As folhas β tem orientação para a esquerda e possuem um ângulo de

aproximadamente 90° entre a primeira e a última (Borrelli e Trono, 2015; Carvalho, 2015; Cortez *et al.*, 2017).

O sítio ativo das α/β hidrolases consiste de uma tríade catalítica altamente conservada composta por um resíduo nucleofílico, que no caso das lipases é sempre uma serina, um resíduo catalítico ácido, que pode ser um ácido aspártico ou ácido glutâmico, e um resíduo catalítico básico, geralmente uma histidina. O resíduo ácido catalítico está localizado após a cadeia β_6 ou β_7 da folha β central e está ligado, por hidrogênio, à histidina catalítica que está localizada em uma alça após a cadeia β_8 da dobra da α/β -hidrolase (Carvalho, 2015).

A reação de hidrólise de um substrato lipídico catalisada por uma lipase se inicia com a ligação do éster do lipídeo à enzima e o ataque do resíduo nucleofílico de serina, presente na tríade catalítica da biomolécula, à carbonila da ligação éster do substrato, resultando na formação de um intermediário tetraédrico. Subsequentemente, este intermediário tetraédrico é clivado, com a consequente liberação do produto álcool, enquanto a cadeia acila é esterificada para a serina nucleofílica, permanecendo um intermediário correspondente à enzima acilada (complexo acil-lipase). Este passo é estabilizado pelos outros dois resíduos do sítio ativo, histidina e ácido aspártico. Na sequência ocorre a desacilação, na qual a molécula de água hidrolisa a ligação covalente da enzima acilada, liberando o ácido carboxílico, quando o grupamento acila é transferido para o grupamento OH de água, e a enzima é regenerada a sua forma nativa. Já em condições não aquosas, durante as reações inversas (esterificação), ocorre a transferência do grupamento acila dos ácidos carboxílicos para nucleófilos diferentes da água (Ray, 2015; Cortez *et al.*, 2017).

As lipases apresentam, com poucas exceções, o fenômeno de ativação interfacial. Considerando o caráter hidrofílico que essas enzimas possuem enquanto seus substratos são compostos hidrofóbicos, elas possuem baixa atividade hidrolítica quando seus substratos são dissolvidos em meio aquoso. Em contrapartida, a atividade delas aumenta acentuadamente quando a concentração do substrato atinge o limite de solubilidade e ocorre a separação da fase lipídica da fase aquosa, ou seja, com o aparecimento de gotículas de gordura no sistema. A presença desse volume de agregado lipídico próximo à superfície da enzima altera o ambiente dielétrico nesta região e os resíduos carregados da proteína interagem mais com um substrato lipídico do que com a água. Dessa forma, a atividade da lipase depende largamente da área interfacial do substrato e não da concentração (Lai *et al.*, 2018; Bogdanova *et al.*, 2016). Uma estrutura de um domínio

móvel, presente na maioria das lipases, é responsável por essa capacidade de ativação interfacial. Essa estrutura é conhecida como "tampa" e consiste de uma única hélice, duas hélices ou um laço composto por uma sequência peptídica anfifílica, responsável pelo acesso ao sítio ativo da enzima. Essa tampa está posicionada de tal maneira que o lado hidrofílico está voltado para o solvente e o local hidrofóbico é disposto em direção ao sítio catalítico. A presença de uma interface óleo-água resulta em um rearranjo da conformação da enzima que desloca a tampa, tornando o sítio catalítico acessível ao substrato lipídico (ou inibidor) e, ao mesmo tempo, a lipase expõe uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação à interface. Já na ausência da interface óleo-água, a tampa cobre o sítio ativo, impedindo assim a atividade da lipase. Essa tampa pode se apresentar de forma variada em algumas lipases, às vezes sendo grande e complexa (lipase de *Geobacillus thermocatenulatus*), muito pequena (lipase B da *C. antarctica*, Lipase da Cobaia) ou duplas (lipase de *Pseudomonas* sp.) (Cortez *et al.*, 2017; Borrelli e Trono, 2015).

2.1.3 PROPRIEDADES DAS LIPASES

As características das lipases dependem principalmente das fontes de extração. Mas de modo geral as propriedades que elas apresentam incluem alta especificidade (Regiospecificidade, Quimiospecificidade e Enantioseletividade), estabilidade à variação térmica, à variação de pH, à presença de íons, a solventes orgânicos, além de possuírem natureza biodegradável e não tóxica e apresentar alta eficiência catalítica e atuarem sem a necessidade de um co-fator (Kiran *et al.*, 2016).

2.1.3.1 ESPECIFICIDADE

A especificidade da lipase é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato, anatomia do sítio ativo da enzima e outros fatores que afetam a ligação da enzima ao substrato (Patil *et al.*, 2011; Kapoor e Gupta, 2012). A lipase atua no substrato de maneira específica e inespecífica, resultando na completa hidrólise dos triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol ou juntamente com triglicerídeos, monoacilglicerídeos e diacilglicerídeos, ácidos graxos e glicerol também são formados (Patil *et al.*, 2011). Dessa forma, as lipases possuem rigorosa especificidade, exibindo uma gama de propriedades de transformação quimio-, régio- e enantiosseletivas em relação aos seus substratos (Messias *et al.*, 2011).

Regioespecificidade (especificidade posicional)

As lipases podem ser divididas em três grupos principais com base em sua especificidade posicional e na capacidade de hidrolisar glicerídeos e ácido graxo: lipases não específicas, com valores do índice de especificidade posicional entre -20 e +30, lipases específicas de ácidos graxos com valores entre 70 e 80 e lipases 1,3 específicas, com o valor de 100 (Kapoor e Gupta, 2012; Lai *et al.*, 2018).

a. Lipases não específicas

São as que catalisam reações em todos os grupos hidroxila do triglicerídeo de uma maneira aleatória, portanto, podem remover o ácido graxo de qualquer posição do triglicerídeo, produzindo ácidos graxos livres e glicerol ou monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Esses intermediários são hidrolisados mais rapidamente que o triglicerídeo e, portanto, não se acumulam na reação. Exemplos destas lipases são *Candida rugosa*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*.

b. Lipases 1,3-específicas

Estas são as que catalisam reações apenas em grupos hidroxila primários de triglicerídios (posições no sn-1 e sn-3) gerando, por esta razão, produtos com composições diferentes das obtidas pelas lipases com outra regioesletividade, ou mesmo por catalisadores químicos, produzindo ácidos graxos livres, 1,2-diacilglicerol ou 2,3-diacilgliceróis e 2-monoacilglicerol. Aqui, 2,3-diacilglicerol e 2-diacilglicerol são quimicamente instáveis, e eles sofrem migração de acila para dar 1,3-diacilglicerol e 1-monoacilglicerol ou 3-monoacilglicerol, respectivamente. Um efeito de impedimento estérico impede a ligação do sítio ativo da lipase aos ácidos graxos da posição sn-2 dos triglicerídios. A maioria das lipases pertence à lipase específica sn-1,3. Exemplo deste grupo de lipase inclui lipase pancreática humana, *Aspergillus niger*, *Rhizomucor delemar*, *Rhizomucor miehei* e *Mucor javanicus*.

c. Lipases ácido graxo específicas

Essas lipases são menos comuns em comparação com outros grupos. Elas apresentam ação específica na hidrólise de ésteres que são formados a partir de ácidos graxos de cadeia longa com ligações duplas entre C-9 e C-10. Lipases de *Geotrichum candidum* é a lipase específica de ácidos graxos mais comum que mostra preferência pelo ácido oleico, sementes de aveia não germinadas também apresentam lipases desse grupo.

Lai *et al.* (2018) relatam também a existência de lipases que apresentam especificidade negativa. Por exemplo, a lipase de *Candida cylindracea* que discrimina o ácido docosa-hexaenóico, a de *G. candidum* contra o g-linolenato no óleo de borragem e a de *Mucor miehei* contra o ácido graxo poliinsaturado gama-linolênico e docosa-hexaenóico. As lipases de seletividade negativa são frequentemente utilizadas para concentrar e enriquecer certos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) em triacilglicerol.

Quimiospecificidade

A quimiosseletividade, também chamada de estereoespecificidade, é definida como a capacidade das lipases em distinguir entre a posição sn-1 e sn-3 no triglicerídeo. As lipases podem mostrar estereosseletividade insignificante ou ser muito estereosseletivas. A estereosseletividade da mesma enzima pode variar de acordo com a estrutura do substrato. Algumas lipases apresentam especificidade por certos ácidos graxos e especificidade para classe lipídica. A especificidade de ácidos graxos está relacionada à liberação de ácidos graxos livres com comprimento ou grau de insaturação que se enquadra em intervalos bem definidos. Para a especificidade da classe dos lipídios, as lipases catalisam não só a hidrólise do triacilglicerol, mas também do diacilglicerol e do monoacilglicerol (Cortez *et al.*, 2017).

Enantioseletividade

Assim, a catálise enzimática permite transferir ou criar centros quirais nas moléculas, assim como distinguir formas enantioméricas. Dessa forma, essa seletividade compreende a capacidade que as lipases possuem de distinguir os enantiomêros de uma mistura racêmica e varia em relação ao substrato, pois está ligada à natureza do éster (Borrelli e Trono, 2015).

2.1.3.2 ESTABILIDADE

As lipases apresentam estabilidade variada em relação às condições temperatura e pH, presença de solventes orgânicos e líquidos iônicos (Kapoor e Gupta, 2012).

Influência do pH e Temperatura

As lipases são ativas sobre uma ampla faixa de pH e temperatura. Essas características cinéticas das lipases variam bastante dependendo de suas fontes. No caso das lipases microbianas, o pH e a temperatura ótimos de reação dessas enzimas dependem do micro-organismo, gênero, espécie e também da cepa e do habitat de origem. Mas de modo geral elas possuem estabilidade que pode variar em pH de 4 a 11 e em temperatura de 10 a 96 °C (Mehta *et al.*, 2017).

Lipases oriundas de micro-organismos termofílicos apresentam elevada estabilidade em altas temperaturas, enquanto micro-organismos psicofílicos, são fontes potenciais de lipases adaptadas ao frio, com elevada atividade em temperaturas muito baixas. De mesmo modo, a partir de micro-organismos alcalofílicos espera-se a obtenção de lipases estáveis em pH acima de 7,0, enquanto de micro-organismos acidofílicos, lipases estáveis em pH abaixo de 7,0 (Sharma *et al.*, 2016; Duarte *et al.*, 2017; Patil *et al.*, 2011).

Influência de solventes orgânicos

As lipases são geralmente estáveis em solventes orgânicos. O uso de solventes orgânicos aumenta a rigidez dessas enzimas, melhorando assim sua especificidade de substrato e sua estabilidade térmica. Muitos estudos relatam o impacto de vários solventes orgânicos, como metanol, etanol, acetona, butanol, hexano, heptano, clorofórmio, n-propanol, ciclohexano, n-hexano, p-xileno e n-butanol, na estabilidade da lipase e demonstram que o solvente utilizado, bem como sua concentração, tempo e temperatura dele na solução influenciam na atividade residual da lipase, estimulando ou inibindo a reação (Verma *et al.*, 2012; Patil *et al.*, 2011).

Influência de Íons metálicos

A estabilidade da lipase também é influenciada por íons metálicos. Eles têm a tendência de produzir complexos com forma ionizada de ácidos graxos, o que resulta na alteração de seu comportamento e solubilidade nas interfaces. Mn^{2+} , Hg^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Na^{+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , Ag^{+} e Cr^{3+} , por exemplo, podem influenciar na atividade catalítica das lipases, estimulando ou inibindo. No entanto a influência desses íons metálicos variam dependendo do tipo de lipase e da quantidade de ácido graxos presente no meio de cultura. Algumas lipases são estritamente dependentes de Ca^{2+} , para ativação da enzima, enquanto Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} têm sido citados como inibidores de algumas tipos de lipases (Sharma *et al.*, 2016; Patil *et al.*, 2011)

2.1.4 IMPORTÂNCIA E APLICAÇÕES DAS LIPASES

Toda essa diversidade e versatilidade nas propriedades enzimáticas e a especificidade do substrato, mencionadas anteriormente, contribuem para a importância biotecnológica das lipases e seu grande potencial em uma ampla gama de processos industriais (Solarte *et al.*, 2014; Shelatkar *et al.*, 2016; Ramos-Sánchez *et al.*, 2015; Singh e Mukhopadhyay, 2012). Elas são reconhecidas como uma das enzimas mais atraentes em escala industrial e o seu uso comercial geram negócios de bilhões de dólares (Shelatkar *et al.*, 2016).

O segmento do mercado de enzimas compreendido pelas lipases está crescendo rapidamente, devido a seus usos emergentes nas indústrias. A enorme atenção que elas têm recebido é evidenciada no aumento da quantidade de informações sobre elas na literatura atual. O desenvolvimento de tecnologias baseadas em lipase para a síntese de novos compostos está expandindo rapidamente os usos dessas enzimas, tornando-as cada vez mais populares. Atualmente são responsáveis por 10% da participação do mercado mundial de enzimas e esse mercado tende a crescer 8,8% até 2025 (Ray, 2015; Sales, 2020).

As lipases apresentam muitas aplicações nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica, biomédica, óleoquímica, agroquímica, energética, ambiental, além da indústria de detergentes e indústrias têxtil, coureira e papelreira (Solarte *et al.*, 2014; Kiran *et al.*, 2016).

2.1.5 FONTES DE LIPASES

As lipases são enzimas amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em tecidos animais e vegetais e em micro-organismos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras), onde seu papel fisiológico é metabolizar lipídios (Singh e Mukhopadhyay, 2012; Abdelmoez *et al.*, 2013; Thakur, 2012; Bogdanova *et al.*, 2016; Nwuche e Ogbonna, 2011).

Dependendo da fonte de produção, as lipases diferem amplamente nas propriedades físicas e bioquímicas, podendo apresentar massa molecular variando de 19 a mais de 170 kDa e atuar numa ampla faixa de pH (4,0-11,0) e de temperatura, a qual varia em até 70 °C.

2.1.5.1 FONTE ANIMAL

Os animais são fontes ricas de lipases. Elas estão presentes em vários tecidos e órgãos deles, como pâncreas, estômago, língua, faringe, sendo responsáveis pela degradação da gordura da dieta e estando envolvidas em vários estágios do metabolismo de lipídios, incluindo a digestão, absorção, reconstituição de gorduras e na degradação e metabolismo de lipoproteínas, como lipase lipoproteica e lipase hepática (Colla *et al.*, 2012).

Lipases de origem animal já foram isolados de muitos insetos, peixes e mamíferos. Entre elas, a lipase mais estudada é a lipase pancreática. Claude Bernard (1856) isolou pela primeira vez a lipase de suco pancreático e verificou que esta enzima solubilizava gotas de óleo, desde então ela é reconhecida com a primeira lipase utilizada para aplicações industriais (Messias *et al.*, 2011). Lipases pancreáticas e lipases pré-gástrica purificados a partir de vitelo, cabra e carneiro são utilizadas na aceleração da maturação do queijo e a produção do aroma, bem como na lipólise de manteiga, gordura e creme. Kiran *et al.* (2016) cita a secagem e moagem de glândulas pré-gástricas na base das línguas dos bezerros como processo de produção de lipase animal.

2.1.5.2 FONTE VEGETAL

Em plantas, as lipases são encontradas em tecidos de reserva de energia (Colla *et al.*, 2012). As lipases de origem vegetal são comumente encontradas em espécies produtoras de sementes oleaginosas, cereais, látex e até em algas marinhas. Isso inclui amendoim, linhaça, colza, palma, soja, aveia, grãos, trigo, arroz e assim por diante.

As sementes oleaginosas são as principais fontes de lipase vegetal. Nessas sementes as lipases estão localizadas principalmente nos corpos lipídicos da aleurona (tegumento) e do embrião. A atividade da lipase é geralmente ausente em sementes não germinadas, mas aparece rapidamente após a germinação, uma vez que elas são necessárias para hidrolisar o TAG armazenado para a síntese de açúcares, aminoácidos e cadeias de carbono, a fim de fornecer energia e carbono para o crescimento embrionário (Borrelli e Trono, 2015).

As lipases vegetais apresentam um peso molecular que varia de 40 a 143 kDa, uma faixa de pH entre 4,0 a 8,0 e uma faixa de temperatura entre 25 a 60°C.

Em comparação com outras fontes de lipases, vegetais receberam pouca atenção (Lai *et al.*, 2018). No entanto, nos últimos anos, a busca por novas fontes de lipases tem sido intensificada, e algumas enzimas vegetais promissoras têm sido investigadas quanto ao seu

potencial uso como biocatalisadores. Um exemplo disso é a exploração das aplicações industriais de lipases obtidas do látex de seringueiras (Borrelli e Trono, 2015).

2.1.5.3 FONTES MICROBIANAS

Todos os grupos de micro-organismos são conhecidos como produtores potenciais de lipases, como fungos, além de actinomicetos e outras bactérias (Thakur, 2012). Essa diversidade microbiana contribui para a produção de lipases com diferentes propriedades funcionais dependendo da fonte de extração. A massa molecular dessas lipases também pode variar, geralmente, entre 20 e 60 kDa (Carvalho, 2015).

As lipases de origem microbianas têm sido mais amplamente aplicadas em processos biotecnológicos e na química orgânica, por oferecerem múltiplas vantagens frente às de origem animal e vegetal, como maior disponibilidade, alto rendimento, custos de produção reduzidos, facilidade de manipulação genética, ausência de flutuações sazonais, maior estabilidade, alto nível de seletividade e ampla disponibilidade e especificidade de substrato (Narasimhan e Bhimba, 2015).

Existem dois tipos básicos de lipase microbiana, quanto à sua forma de obtenção: a lipase intracelular, também chamada lipase de célula integral, que permanece no interior da célula ou ligada à sua membrana ou parede celular, e a lipase extracelular, que é secretada da célula para o meio de cultura permitindo um processo conveniente e fácil de isolamento, separação e purificação.

Um número considerável de lipases fúngicas e bacterianas já são comercialmente produzidas (Wadia e Jain, 2017), mas a demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características catalíticas estimula o isolamento e a seleção de novas linhagens (Treichel *et al.*, 2010).

2.1.5.3.1 BACTÉRIAS

As bactérias são potenciais candidatas à produção de enzimas. Entre todas as fontes bacterianas para produção de lipases, as pertencentes ao gênero *Bacillus* apresentam propriedades notáveis. *Bacillus pumilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus* são as bactérias mais comuns produtoras de lipases. As lipases de *Pseudomonas*, que provavelmente foram as primeiras estudadas, e de *Streptomyces* também recebem destaque e são bastante investigadas, seguidas de *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* e *Arthrobacter* (Kiran *et al.*,

2016; Shelatkar *et al.*, 2016). Thakur (2012) também relata *Pseudomonas sp.*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia multivorans*, *B. cepacia* e *Staphylococcus caseolyticus* como produtores de lipase bacteriana.

Normalmente, as lipases bacterianas apresentam um o peso molecular varia de 11 a 176 kDa e possuem pH ótimo neutro ou alcalino. Porém possuem estabilidade em uma ampla gama de pH (4 a 11). Lipases bacterianas geralmente têm temperatura ótima na faixa de 30-60 ° C, no entanto, há relatos de lipases bacterianas com ótimos em ambos os extremos, muito abaixo de 30°C ou muito acima de 60°C.

2.1.5.3.2 FUNGOS

As principais fontes de lipases utilizadas em processos industriais são os fungos filamentosos, seguidos de leveduras, bactérias e animais. Os fungos são considerados os mais importantes e atualmente têm sido considerados as fontes preferenciais de lipases para aplicações industriais (Rodrigues *et al.*, 2016).

Isso porque as lipases fúngicas geralmente não são nocivas à saúde humana, sendo então reconhecidas como GRAS (*Generally Regarded As Safe*), diferente do que acontece com muitas lipases bacterianas. Além disso, os fungos são considerados micro-organismos seguros e fáceis de manipulação (Rodrigues, 2015), e geralmente produzem enzimas extracelulares que facilitam a recuperação da lipase dos meios de fermentação (Mahmoud *et al.*, 2015), embora também haja uma expectativa crescente do seu emprego como biocatalizadores na forma de células integrais e ou biomassa catalítica livre ou imobilizada, simplificando e reduzindo o custo dos processos reacionais nos quais são utilizados.

Os fungos filamentosos também possuem a habilidade de crescer em substratos bastante simples e de baixo custo, e algumas lipases fúngicas podem apresentar benefícios sobre as lipases bacterianas quanto a sua estabilidade térmica e pH, especificidade do substrato e atividade em solventes orgânicos. Geralmente, a faixa de pH das lipases fúngicas varia entre 4,0 a 11,0 e a faixa de temperatura varia entre 25 a 60°C, exceto para alguns fungos termofílicos que possuem temperatura ótima entre 45 e 75°C. Quanto ao peso molecular, essas lipases variam de 27 a 120 kDa.

Estas características, juntamente aos avanços no conhecimento da fisiologia, bioquímica e genética dos fungos e a crescente demanda industrial por lipases com características catalíticas variadas estimularam a exploração do imenso potencial para a produção de lipase oferecido por esses micro-organismos (Shelatkar *et al.*, 2016).

Tecnologia genética também tem sido aplicada a produção de lipases fúngicas, clonando e superexpressando genes que codificam a lipase em fungos filamentosos e leveduras (Treichel *et al.*, 2010).

Fungos de diversos gêneros são bons produtores de lipases e têm sido estudados do ponto de vista acadêmico e industrial, tanto os fungos filamentosos como as leveduras. Fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp. e *Rhizomucor* sp. são produtores de lipase com destacada aplicação comercial (Marotti *et al.*, 2017). *Ashbya*, *Beauveria*, *Humicola*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Eurotrium*, *Ophiostom*, *Trichoderma* e *Fusarium* sp. também são reconhecidos como produtores de lipase. Enquanto as principais espécies de leveduras produtoras de lipase comercialmente importantes pertencem aos gêneros: *Candida*, *Yarrowia* e *Thermomyces*. Espécies do gênero *Rhodotorula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* e *Trichosporon* também são citadas.

2.2 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASE POR FUNGOS

2.2.1 OBTENÇÃO DO INÓCULO

Devido à habilidade de crescer numa ampla gama de substratos e ambientes naturais ou impactados, como solos contaminados com petroderivados, óleos e graxas, plantas e animais vivos ou em decomposição, sementes oleaginosas, alimentos deteriorados, além de resíduos industriais e domésticos oleosos ou gordurosos e fábricas de processamento de óleo vegetal, produtos lácteos, os fungos possuem a capacidade de expressar e excretar enzimas lipolíticas (Cortez *et al.*, 2017). Além disso, ainda podem ser fornecidos por centros de coleta biológicas, como as micotecas, ou de fabricantes da indústria (Lai *et al.*, 2018).

Desta forma, a natureza e os ambientes estimulam os fungos a produzirem lipases, as quais podem apresentar novas propriedades e aplicações, uma vez que a produção, bem como suas características enzimáticas varia de acordo com a cepa produtora. Por isso, apesar do grande avanço nos últimos tempos, pesquisas para isolar e selecionar novas linhagens de fungos lipolíticos continuam sendo estimuladas, a fim de atender a demanda industrial por lipases cada vez mais específicas para os processos ao qual são destinadas.

2.2.2 PROCESSO FERMENTATIVO

Existem, basicamente, dois diferentes processos fermentativos que podem ser empregados para produção enzimática por fungos, comumente classificados quanto à condução do processo, quanto ao modo de cultivo, ou seja, a fermentação submersa (FSM) e fermentação em estado sólido (FES) (Feitosa et al, 2010).

A diferença destes dois processos é que na FES um suporte sólido é utilizado para o crescimento do fungo. Este suporte pode ser sintético, como no caso da espuma de poliuretano, mas geralmente ele é natural, utilizando o próprio substrato sólido como fonte de nutrientes e suporte fisiológico. A FES é caracterizada ainda pela ausência total ou quase total de água livre (Oliveira et al., 2013). Enquanto a fermentação submersa (FSM) designa-se como um processo pelo qual se utiliza um meio fermentativo líquido, onde o desenvolvimento do fungo pode se dar de forma estática ou sob agitação, utilizando fontes de nutrientes solúveis (Orlandelli et al., 2012).

Ambos os processos fermentativos apresentam vantagens e desvantagens, quanto à produção de enzimas. Como vantagens, a FES apresenta: meio de cultura simples e condições de cultura similares às daquelas do habitat natural dos fungos, fácil aeração devido à porosidade do material, menor exigência de água quando comparada à FSM, diminuição do risco de contaminação do meio, possível baixo investimento, utilização direta dos sólidos fermentados, extração facilitada pela alta concentração de produtos, baixa demanda de energia. (Colla et al., 2016; Rodrigues, 2015) Já entre as desvantagens da FES podem ser citadas: não homogeneidade do meio de cultivo, dificuldade de monitorar e controlar os parâmetros operacionais (temperatura, pH e umidade) e de pré-tratamento dos suportes (umidificação, homogeneização, dispersão, tratamento térmico e enzimático) e alta taxa de inoculação microbiana quando não se utiliza a microbiota natural (Orlandelli et al., 2012). Como vantagens da FSM podem ser consideradas a relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante a homogeneidade do meio e maior controle dos parâmetros do processo, facilidade na recuperação de lipases extracelulares e determinação da biomassa por filtração simples ou centrifugação. No entanto, o fator econômico é uma das desvantagens deste processo, já que os meios utilizados no preparo da fermentação muitas vezes apresentam alto custo, além disso, a grande quantidade de água utilizada aumenta a probabilidade de contaminação.

Por tudo isso, a produção de lipase em escala industrial por fungos tem sido desenvolvida principalmente por fermentação submersa (FSM), devido aos aspectos de

engenharia dominados e desenvolvidos, sendo considerada tecnicamente mais viável frente à FES, apesar de suas desvantagens (Rodrigues, 2015; Messias et al., 2011; Orlandelli et al., 2012; Cortez et al., 2017). Embora os processos em estado sólido também sejam mencionados como uma alternativa viável para a produção enzimática (Colla et al., 2012). Além disso, embora o cultivo submerso seja comumente utilizado, no caso específico dos fungos filamentosos é importante considerar que essa forma de cultivo pode levar à alteração da expressão gênica para características fenotípicas como o crescimento, a produção de metabólitos secundários e a atividade enzimática, e que, por outro lado, fungos desenvolvidos em processos fermentativos sólidos, por contarem com condições similares às naturais, mantém a produção e favorecem a obtenção de maiores quantidades de enzimas.

2.2.3 COMPOSIÇÃO DO MEIO FERMENTATIVO

Além de fatores físico-químicos, tais como temperatura, pH, agitação e concentração de oxigênio dissolvido, a produção de lipase por fungos também é muito influenciada por fatores nutricionais, como fontes de carbono e nitrogênio, presença de lipídios e sais inorgânicos. A fonte de carbono, inclusive, é considerada o principal fator para a expressão da atividade da lipase, uma vez que são enzimas indutíveis, ou seja, produzidas pelo fungo na presença de um indutor, que pode ser o próprio substrato ou o produto da sua hidrólise, o qual pode ser adicionado ao meio de cultivo a fim de estimular a produção enzimática (ROVEDA et al., 2010). Por isso, as fontes de carbono lipídicas podem ser consideradas essenciais para a obtenção de um alto rendimento em lipase, e fontes de nitrogênio e micronutrientes também devem ser consideradas para o crescimento microbiano e a otimização da produção da enzima. Dessa forma, é recomendada a seleção cuidadosa das fontes nutricionais nos processos fermentativos para produção de lipase.

Para atender os requisitos nutricionais dos fungos e produção de lipase podem ser utilizados vários meios como aqueles baseados em compostos definidos (meio sintético), como açúcares e óleos, e componentes complexos como extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte, peptona, uréia, sulfato de amônio, nitrato de amônio, CaCl₂ (Kiran et al., 2016). As matérias primas utilizadas, como fontes indutoras, de carbono e de nitrogênio orgânicas, são geralmente óleos vegetais, principalmente o óleo de oliva, devido a sua grande proporção de trioleína, substrato ideal para muitas lipases (Oliveira et al., 2013). Óleos e azeites de palma, Tween 20 e 40, trioleína e tripalmitina, frutose, óleos de

soja, girassol, algodão e milho, também são mencionados. Porém, como desvantagem o uso de um substrato de alto custo pode ocasionar um grande aumento do valor do produto e inviabilizar a produção em escala industrial, sendo importante, portanto, o barateamento destes componentes do meio (Messias et al., 2011).

Para baratear a produção destas enzimas algumas estratégias podem ser adotadas, como a substituição dos componentes do meio de cultivo por materiais de baixo custo ou até mesmo resíduos. A utilização de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de lipases favorece, sem dúvida, a redução dos custos de produção associados aos substratos (Thakur, 2012).

2.2.3.1 RESÍDUOS INDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE LIPASE

A agroindústria dispensa toneladas de resíduos, aparentemente sem função, que podem conter muitas substâncias de alto valor agregado ou serem convertidos em produtos comerciais ou matérias primas para processos secundários, se empregados de forma adequada (Ladeira, 2009). Nos últimos anos, por exemplo, diversos resíduos agroindustriais têm sido estudados como substratos em processos fermentativos para produção de químicos finos e enzimas, incluindo lipases (Araujo, 2013). Dessa forma, além de fornecer substratos alternativos, muitas vezes de grande disponibilidade e de baixo custo, para produção enzimática, a utilização desses resíduos ainda pode ajudar a solucionar problemas de poluição, que poderiam ser causados por seu descarte. (Treichel et al., 2010).

A utilização de meios de culturas constituídos de resíduos industriais também tem representado um recurso potencial na produção de lipase por fungos, uma vez que muitos são ricos em nutrientes como proteínas, carboidratos, lipídios e sais minerais, dentre outras substâncias de interesse, que podem ser facilmente metabolizados por eles. (Cai et al., 2017; Lopes et al., 2018). Como exemplo podem ser citados farelo de soja, farelo de trigo, farelo de amendoim, sabugo de milho, casca de manga, torta de babaçu, casca de arroz, casca de lentilha, resíduo de banana, resíduo de melancia, resíduo de melão, melaço de cana, bagaço de babaçu moído, licor de maceração de milho, efluente de um matadouro (rico em óleo e gordura), entre outros, desde que também contenham os componentes necessários suprir as exigências nutricionais dos fungos (Singh & Mukhopadhyay, 2012). Colla et al., 2012 A combinação de diferentes substratos também é relatada, quando não é possível obter todos os recursos nutricionais necessários em um único substrato

(Abdelmoez et al., 2013). Por tudo isso, os resíduos agroindustriais têm ganhado destaque em pesquisas sobre a seleção de substratos adequados para os processos fermentativos, se demonstrando como alternativa bastante promissora também para produção de lipase por fungos.

2.2.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE

Os mecanismos que regulam a biossíntese de lipases variam de forma significativa entre os diferentes micro-organismos. Por isso, após o rastreamento dos fungos produtores de lipase, muitos pesquisadores direcionam suas atividades para o estudo da otimização da composição do meio de cultivo e das variáveis operacionais, a fim de definir as condições ótimas e os requerimentos nutricionais para a produção desta enzima e, assim, obter altos rendimentos dela a custos menores (Colla et al., 2016). A otimização das condições de cultivo é de grande importância uma vez que o crescimento e as distintas atividades metabólicas dos fungos são respostas às condições do ambiente físico-químico que os rodeia. Os parâmetros vitais que afetam o crescimento fúngico e a produtividade enzimática, compreendem fatores nutricionais, como fonte de nitrogênio, fonte de carbono, fonte lipídica, surfactantes e íons metálicos, e fatores físicos como tempo de incubação, pH, temperatura, tamanho do inóculo e condição de agitação aeração (Lai et al., 2018).

Na busca pela otimização das condições de cultivo é necessário analisar como a manipulação dessas variáveis afetam o desempenho. A mudança de uma variável de cada vez, mantendo as outras constantes, é uma prática que não tem se mostrado eficiente, por que não explica os efeitos de interação entre variáveis e seus efeitos no processo fermentativo. (Singh e Mukhopadhyay, 2012). O desenvolvimento e validação de modelos matemáticos são ferramentas importantes para o controle do processo e otimização (Thakur, 2012). A otimização estatística dos processos apresenta vantagens em relação à prática clássica de alterar uma variável de cada vez, como o menor número de experimentos e a possibilidade de avaliar os efeitos de interação entre as variáveis. Uma abordagem eficiente e amplamente utilizada é a aplicação de projetos de Plackett-Burman que permitem a triagem eficiente de variáveis-chave para otimização adicional de maneira racional (Colla et al., 2016).

Com o avanço da biotecnologia, o desempenho da lipase pode ser ainda melhorado através de técnicas como mutagênese química e física, bem como modificação genética (Lai et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial de água de lavagem de galões contendo óleo pós-fritura na produção de lipase por fungos e analisar o valor da biomassa residual produzida.

3.2 Objetivos Específicos

- Utilizar efluente industrial como substrato para produção de lipase;
- Quantificar a atividade da lipase produzida por fungos lipolíticos;
- Analisar as propriedades cinéticas das lipases produzidas;
- Avaliar a fitotoxicidade do material residual;
- Propor uma utilidade para biomassa residual produzida;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Efluente

O efluente foi cedido pela empresa ASA Ind. e Com. - Fábrica Recife, que recolhe o óleo de fritura em residências, restaurantes, hospitais, hotéis e comunidade em geral para a produção de sabão. Entretanto, para a lavagem dos galões de coleta do óleo a ASA tem tido problemas, pois a água residual da lavagem ainda contém um percentual elevado de óleo e não podem ser descartados nos corpos hídricos. Dessa forma, a empresa vem procurando meios para minimizar os problemas na estação de tratamento de efluente e a diminuição dos altos custos gerados pelos tratamentos químicos. Por isso, nesta pesquisa, esse efluente oleoso foi utilizado para a produção de lipase por fungos, o que, por sua vez, solucionaria os problemas com o seu descarte.

4.2 Fungos filamentosos

Dez cepas fúngicas provenientes do solo de Serra Talhada-PE, disponibilizadas pela Coleção de Culturas UCP (UNICAP), encontrando-se também uma replica de cada uma delas depositada na Micoteca URM-UFPE (Tabela 1).

Tabela 1. Lista das cepas fúngicas estudadas.

Registros na URM	Nome
URM 7651	<i>Rhizopus arrhizus</i>
URM 7652	<i>Rhizopus microsporus</i>
URM 7653	<i>Cunninghamella echinulata</i>
URM 7654	<i>Rhizopus arrhizus</i>
URM 7655	<i>Cunninghamella elegans</i>
URM 7656	<i>Rhizopus microsporus</i>
URM 7657	<i>Lichtheimia hyalospora</i>
URM 7658	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>
URM 7659	<i>Mucor subtilissimus</i>
URM 7660	<i>Cunninghamella echinulata</i>

4.3 Produção de extrato enzimático por fermentação submersa

Inicialmente os fungos foram cultivados em ágar Sabouraud modificado, acrescido de 5% de óleo de fritura, para aclimação, e incubados a 30°C por 4 dias. Posteriormente, dez blocos de gelose (Ø9mm) provenientes das culturas foram inoculados em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL do meio Bushell Haas (BH) e 5% do efluente como fonte de carbono, e mantidos estáticos por 7 dias a 30 °C. Após a fermentação

submersa, o caldo fermentado foi separado por filtração e submetido a dosagem da atividade lipolítica.

4.4 Detecção de atividade lipolítica

Para a detecção da lipase foi seguido o método descrito por Winkler e Stukmann (1979) e modificado por Lima et. al. (2004), baseado na hidrólise do palmitato de p-nitrofenila na presença da enzima, em meio aquoso contendo como surfactantes goma arábica (Sigma) e Triton X-100 (Sigma). Para calcular atividade lipolítica foi utilizada a equação abaixo, sendo uma Unidade de Atividade Enzimática (U) definida como a liberação de 1 μmol de pNP (p-nitrofenol) por minuto. O coeficiente de extinção molar do pNPP, em pH 7,0, ($9,78.103 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura.

EQUAÇÃO 1: Cálculo da atividade lipolítica.

$$A = \frac{C_{ang} \cdot 60 \cdot ND}{\varepsilon \cdot X_{enz}}$$

Sendo:

A: absorbância; C_{ang} : coeficiente angular obtido da cinética de reação (absorbância x tempo em segundos); 60: transformação de segundos para minuto; ND: número de diluições; ε : coeficiente de extinção molar do pNPP a pH 7,0; X_{enz} : volume (em mL) ou massa da enzima imobilizada (mg).

Para a quantificação de proteínas totais, e assim, determinar a atividade específica da lipase nas amostras foi utilizado o método de Bradford (1976), sendo utilizadas também as formulas abaixo:

EQUAÇÃO 2: Cálculo da determinação das proteínas totais.

$$\mu\text{g/ml} = \frac{\text{Absorb.} - 0,0013 \times 7}{0,0122}$$

EQUAÇÃO 3: Cálculo da atividade específica da lipase

$$U/\mu\text{g} = \frac{X}{Y}$$

Sendo: X – lipase (U); Y- proteína (U/ μg)

4.5 Teste de antagonismo microbiano

Entre as cepas fúngicas selecionadas foi realizado, em triplicata, um teste de antagonismo segundo a metodologia de ICHIKAWA et. al, (1971). Dessa forma, uma suspensão de esporos (10^7) de um dos fungos foi espalhada em placa contendo Ágar Saboraud, em seguida, os demais fungos foram inoculados de maneira equidistantes e mantidos a 30°C por 24hs. Os halos de inibição formados foram analisados com auxílio de um Contador de Colônias modelo CP600 Plus e um paquímetro digital, sendo considerados positivos todos os halos maiores que Ø40mm.

4.6 Produção de extrato enzimático por consórcios fúngicos

Após o teste de antagonismo as cepas fúngicas selecionadas foram combinadas entre si, de modo a constituírem quatro consórcios fúngicos distintos. Para avaliar a produção de lipase por cada consórcio formado, um total de seis blocos de gelose (Ø9mm), provenientes das culturas que constituem cada consórcio, foram inoculados em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL do meio Bushell Haas (BH) e diferentes concentrações do efluente (4%, 7% e 10%), sendo mantidos estáticos por 7 dias a 30 °C. Após a fermentação submersa, o caldo fermentado foi separado por filtração e submetido à dosagem da atividade lipolítica para selecionar o melhor consórcio.

4.7 Produção de lipase extracelular

Com o intuito de aumentar a produção de lipase, foi realizado um planejamento central composto 2^3 , com quatro repetições no ponto central para estimativa do erro experimental. O delineamento experimental (níveis de variação de -1 a +1) totalizou 12 experimentos, avaliando o efeito do pH (5 a 9), concentração do efluente (10% a 20%) e volume de NH_4NO_3 (1g a 3g) na produção de lipase excretada pelos consórcios selecionados. A análise da significância dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de lipase foi aferida através do programa Statistic versão 7.0 (StatSoftCO. USA).

4.8 Produção enzimática em biorreator

Para avaliar a produção enzimática numa escala maior, foram utilizados biorreatores de 3L a partir do delineamento experimental. No total foram montados quatro experimentos, um com o melhor consórcio, dois com cada fungo de forma isolada e um com o controle abiótico, isto é, sem inoculação dos fungos. Após incubação por 5 dias em temperatura ambiente, o caldo fermentado dos biorreatores foi separado por filtração e

submetido a dosagem da atividade lipolítica, para selecionar o melhor ensaio para realização do estudo cinético, além do teste de fitotoxicidade.

4.9 Cinética de atividade enzimática

4.9.1 Determinação das melhores temperatura e pH para reação

O extrato enzimático do melhor biorreator foi incubado em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70 e 80°C), com a finalidade de determinar a melhor temperatura de reação. Também foi incubado em soluções tampões em diferentes valores de pH (3,5-8,0), para determinação do melhor pH (OLIVEIRA et al, 2016).

4.9.2 Determinação da estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi avaliada através de incubação do extrato enzimático na melhor temperatura de reação por 5, 10, 20, 30, 60, 75, 90, 105 e 120 min na ausência de substrato. Alíquotas de 0,5 ml foram retiradas, sendo determinada a atividade da lipase (OLIVEIRA et al, 2016).

4.9.3 Estabilidade em diferentes valores de pH

A estabilidade do extrato enzimático em diferentes valores de pH foi testada com amostras preparadas na proporção de 1:1, enzima: tampão (v/v), utilizando o tampão em escala de 4,0 a 8,0, com variação de 0,5 pontos entre cada amostra. Após 24 h de incubação, em temperatura ambiente (~25 °C), foi determinada a atividade da lipase (OLIVEIRA et al, 2016).

4.10 Toxicidade de subprodutos formados

Para avaliação da toxicidade do material residual, foram utilizadas as sementes de pepino (*Cucumis sativus*) de acordo com Tiquia et al. (1996). Após desinfestação, dez sementes foram colocadas equidistantes em placas de Petri com papel filtro duplo, nos quais foram embebidos com 2 mL do material residual. Os testes foram realizados em triplicata com o auxílio de dois controles, um com água destilada como controle positivo e outro apenas com o efluente como o controle negativo. O período de incubação foi realizado por 5 dias em ± 30 °C, após isso as raízes das sementes foram medidas com o auxílio de um paquímetro digital para se calcular a percentagem do índice de germinação.

O Índice de Germinação (IG) foi calculado combinando o Percentual de Germinação (%G) e o Percentual de Crescimento das Raízes (%CR), por meio das seguintes equações:

- Percentual de Germinação (%G):

$$\%G = \frac{MSG}{MSGC} \times 100$$

MSG (media de Sementes Germinadas) e MSGC (Média de Sementes Germinadas no Controle)

- Percentual de Crescimento das Raízes (%CR):

$$\%CR = \frac{MCR}{MCRC} \times 100$$

MCR (média de Crescimento das Raízes) e MCRC (Média de Crescimento das Raízes no Controle)

- Índice de germinação (IG):

$$IG = \frac{(\%G) \times (\%CR)}{100\%}$$

(%G) Percentual de Germinação e (%CR) Percentual de Crescimento das Raízes.

4.11 Composição centesimal de biomassa fúngica residual

4.11.1 Obtenção da Biomassa

Ao final da fermentação submersa, a biomassa foi separada do extrato enzimático por filtração em papel filtro sendo, em seguida, lavada com água destilada e detergente (comercial) para remoção de compostos residuais do micélio fúngico. Para a determinação da composição centesimal da biomassa fúngica, foram realizadas, em duplicata, as seguintes análises:

4.11.2 Determinação da umidade e substâncias voláteis

Uma amostra de 5 g foi pesada em cápsula de porcelana, previamente tarada. Após isso, a amostra foi aquecida a 105°C durante 3 horas, seguida de resfriamento em

dessecador até a temperatura ambiente. O resíduo obtido foi pesado e a operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até peso constante.

Cálculo: $\frac{100 \times N}{P} = \text{umidade ou substâncias voláteis a } 105^{\circ}\text{C por cento m/m}$

N = n° de gramas de umidade (perda de massa em g)

P = n° de gramas da amostra

4.11.3 Determinação do resíduo seco

Como alternativa, o resíduo seco pode ser calculado subtraindo-se de 100 g da amostra o número de g de “umidade por cento”. Considere a diferença como o n° de g do “resíduo seco por cento”.

Cálculo:

100 - A = resíduo seco por cento m/m

A = n° de g de umidade por cento

4.11.4 Determinação do resíduo incinerado – Cinzas

Uma amostra de 5 g foi pesada em uma cápsula de porcelana, previamente incinerada, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e tarada. Após isso, a amostra foi carbonizada em temperatura baixa e incinerada em mufla a 550°C até eliminação completa do carvão, seguida de resfriamento em dessecador até a temperatura ambiente. A operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até peso constante.

Cálculo: $\frac{100 \times N}{P} = \text{cinzas por cento m/m}$

N = n° de g de cinzas

P = n° de g da amostra

4.11.5 Determinação de Lipídios – Extração direta em Soxhlet

Uma amostra de 5 g foi pesada e colocada em papel de filtro. Após isso, o papel de filtro foi transferido para o aparelho extrator tipo Soxhlet, ao qual foi acoplado um balão de fundo chato previamente tarado a 105°C. Foi adicionado éter em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio e adaptado a um refrigerador de bolas, mantendo, sob aquecimento

em chapa elétrica, à extração contínua por 16 horas (duas a três gotas por segundo). Em seguida, o papel de filtro foi retirado, o éter destilado e o balão com o resíduo extraído transferido para uma estufa a 105°C, mantendo por cerca de uma hora, seguido de resfriamento em dessecador até a temperatura ambiente. O balão com o resíduo foi pesado e foram repetidas as operações de aquecimento por 30 minutos na estufa e resfriamento até peso constante (no máximo 2 h).

$$\text{Cálculo: } \frac{100 \times N}{P} = \text{lipídios ou extrato etéreo por cento m/m}$$

N = nº de gramas de lipídios

P = nº de gramas da amostra

4.11.6 Determinação de Proteína – Método de Kjeldahl

Um grama da amostra foi pesada em papel de seda, transferida para o balão de Kjeldahl (papel+amostra) e adicionado 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1,5 g de mistura catalítica. Em seguida, foi levado ao aquecimento em chapa elétrica, na capela, até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não digerido (pontos pretos). Após o esfriar foram adicionadas 10 gotas do indicador fenolftaleína e 1 g de zinco em pó e o material submetido à destilação. A extremidade afilada do condensador foi mergulhada em 25 mL de ácido sulfúrico 0,05 M, contido em frasco Erlenmeyer de 500 mL com 3 gotas do indicador vermelho de metila. Ao frasco que contém a amostra digerida foi adicionado, por meio de um funil com torneira, solução de hidróxido de sódio a 30% até garantir um ligeiro excesso de base. Em seguida foi aquecido à ebulição e destilado até obter entre 250-300 mL do destilado. O excesso de ácido sulfúrico 0,05 M foi titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, usando vermelho de metila.

$$\text{Cálculo: } \frac{V \times 0,14 \times f}{P} = \text{protídios por cento m/m}$$

V = diferença entre o nº de mL de ácido sulfúrico 0,05 M e o nº de mL de hidróxido de sódio 0,1 M gastos na titulação.

P = nº de g da amostra

f = fator de conversão

4.11.7 Determinação de Carboidratos e fibras

A fração dos Carboidratos e fibras foi obtida pela diferença entre o total das demais frações e 100%.

Cálculo:

$$\text{Carboidratos + fibras} = (\text{Umidade} + \text{Cinzas} + \text{Lipídeos} + \text{Proteínas}) - 100$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção de extrato enzimático por fermentação submersa

Dentre as cepas fúngicas testadas, *C. bertholletiae* (URM 7658) foi a que apresentou a maior atividade lipolítica, com 0,591 U/ml, seguida por *Rhizopus microsporus* (URM 7652) e *C. echinulata* (URM 7660), com 0,5443 U/ml e 0,5276 U/ml, respectivamente. Por isso, foram então selecionadas para a etapa seguinte. A figura 2 mostra a comparação da atividade lipolítica específica dos extratos enzimáticos produzidos.

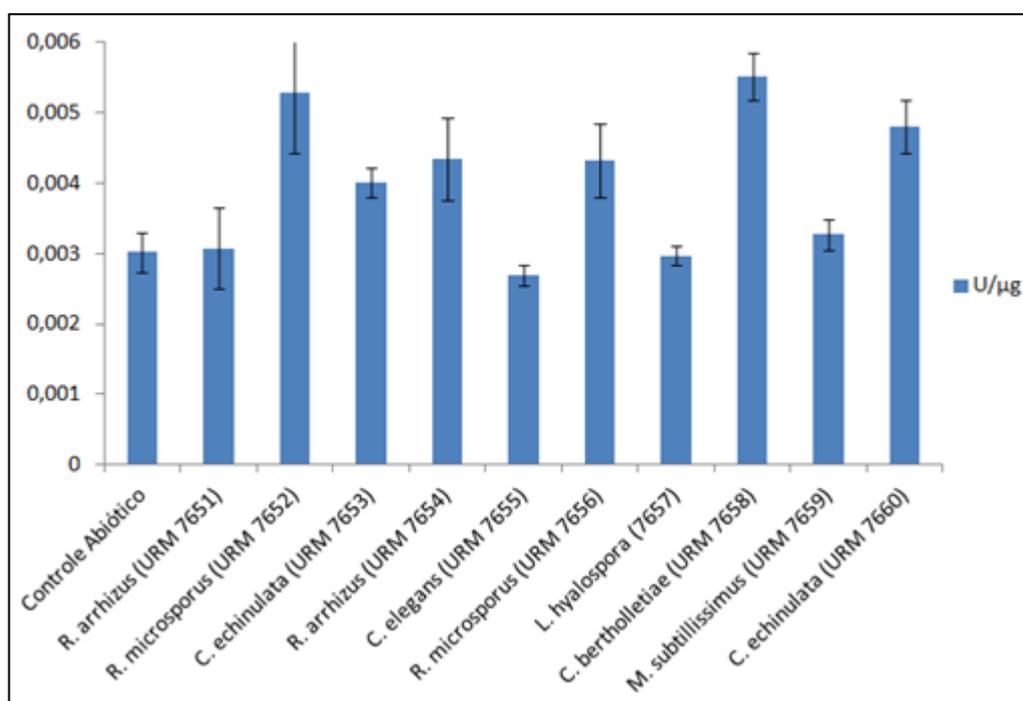


Figura 1: Atividade lipolítica específica produzida por 10 cepas fúngicas utilizando efluente de óleo pós fritura.

Quanto à utilização de resíduo industrial para este mesmo fim, outros autores obtiveram resultados mais satisfatórios. Abdelmoez et al. (2013) obteve uma atividade máxima de 7 U/ml utilizando dois resíduos industriais do refino de petróleo e da indústria oleoquímica como substrato para produção de lipase por *Candida rugosa*. Roveda et al. (2010) utilizaram efluente de laticínios para o isolamento de micro-organismos e como substrato para a produção de lipases, obtendo 21 fungos isolados, dos quais os pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* apresentaram as maiores atividades enzimáticas, de 1,250 a 2,250 U. Rodrigues et al. (2016) avaliou a atividade lipolítica de cem isolados de

fungos, obtidos a partir de escumas de caixa de gordura e esgoto, solo e tecidos necrosados de plantas e insetos, dos quais, *Penicillium sp.* e *Rhizomucor sp.* apresentaram elevada atividade lipásica sobre a espuma de caixa de gordura. Salgado et al. (2016) avaliou a produção de enzimas durante processo de biorremediação de águas residuais dos moinhos de azeitona (OMW) e das vinhas (VS), detectando elevada produção de lipase por *Aspergillus ibericus*, *Aspergillus uvarum* e *Aspergillus niger*, dos quais *A. ibericus* recebeu destaque, com atividade de 2927,0 U/L. Em estudos desenvolvidos por Muruci et al. (2012), utilizando borras de milho, de girassol e de canola mostraram potencial para utilização como indutores para a produção de lipase por *Aspergillus niger* em FES, obtendo 215 U/gms, 238 U/gms e 218 U/gms de atividade, respectivamente.

Foi possível perceber uma predominância de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* na literatura. Porém, segundo Gopinath *et al.* (2013) a produção de lipase extracelular por fungos Zigomicetos, também é bem estudada, o que justifica a utilização deles neste estudo. *Rhizopus*, *Mucor* e *Rhizomucor* são os gêneros mais citados na produção de lipase (Sharma et al., 2016; Pandey et al., 2015; Colla et al., 2012; Singh e Mukhopadhyay, 2012; 2012 Verma et al., 2012). *Cunninghamella verticillata*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus stolonifer*, *Absidia corymbifera*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus* e *Rhizopus stolonifer* são também algumas espécies de fungos zigomicetos citadas como potenciais para a produção de lipases (Singh e Mukhopadhyay, 2012; Gopinath et al., 2013).

5.2 Teste de antagonismo microbiano

Após 24h de crescimento a 30°C, o teste qualitativo de antagonismo entre as cepas selecionadas não apresentou halo de inibição acima dos \varnothing 40mm, sendo, portanto, considerado negativo para as cepas testadas, ou seja, admitindo a combinação entre si para a formação dos consórcios micobianos (**Quadro 1**).

Quadro 1: Consórcios micobianos montados e sua respectiva composição.

Consórcio	Composição		
A	<i>R. microsporus</i>	<i>C. bertholletiae</i>	
B	<i>R. microsporus</i>	<i>C. echinulata</i>	
C	<i>C. bertholletiae</i>	<i>C. echinulata</i>	
D	<i>R. microsporus</i>	<i>C. bertholletiae</i>	<i>C. echinulata</i>

A ausência de halos expressivos no teste de antagonismo é um importante indicio de que os fungos podem se desenvolver de forma cooperativa, garantindo o sucesso do consórcio. Segundo Fernandes (2017), a combinação de culturas fúngicas apresenta muitas vantagens frente às monoculturas, incluindo a melhora na produtividade, adaptabilidade e utilização do substrato. Abdullah et AL. (2019) também defende que a utilização de linhagens de fungos em consórcio melhora a ação sinérgica destes micro-organismos. Dessa forma a utilização de consórcios microbianos pode ser uma alternativa também para fermentação de efluentes e resíduos industriais de composição complexa, por serem capaz de potencializar o processo de degradação dos substratos (Cruz, 2017).

Abdullah et AL. (2019) também montou um consórcio fúngico para obter um maior potencial enzimático por *Aspergillus niger* e *A. flavus*. Rodrigues e Ayub (2011) comprovou que a combinação de lipases de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* resultou em maior rendimento na hidrólise do óleo de soja, substrato heterogêneo composto por diferentes ácidos graxos, em comparação aos obtidos usando apenas uma das enzimas.

5.3 Produção de lipase pelos consórcios

Em relação às concentrações de efluente testadas, todos os consórcios apresentaram maior produção lipolítica com a utilização do efluente na concentração de 10% (Figura 2).

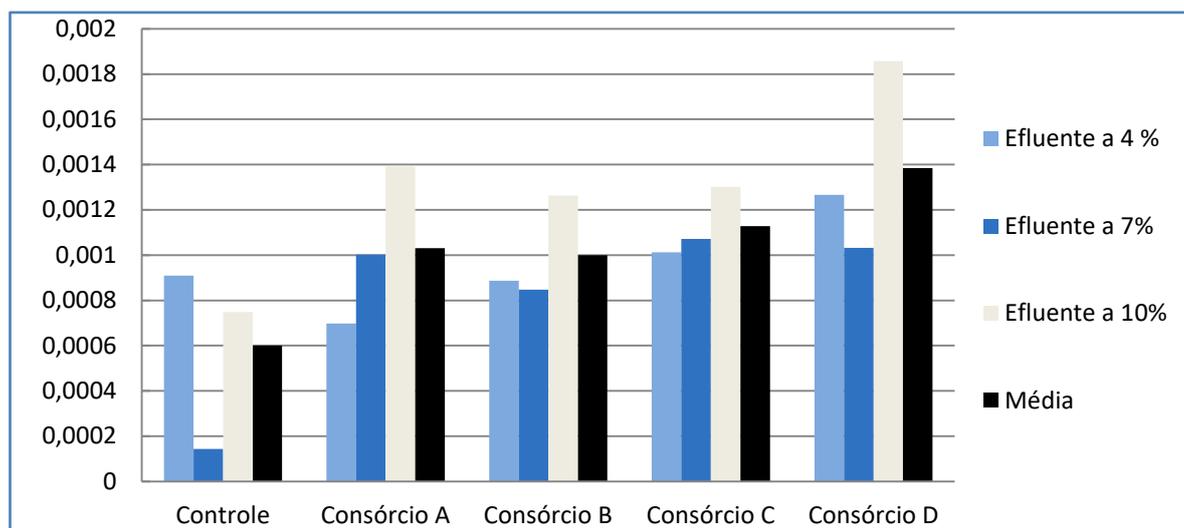


Figura 2: Produção lipolítica pelos consórcios A, B, C e D, em U/μg, em função da concentração do efluente oleoso.

As lipases são consideradas enzimas induzíveis (Thakur, 2012), e os óleos e gorduras são bons indutores na elevação dos índices de produtividade de enzimas lipolíticas (Rigo, 2009). Por isso, com o aumento na concentração do efluente houve também um aumento na disponibilidade de substrato lipídico presente no meio, o que induziu uma maior produção de lipase pelos fungos, justificando os resultados obtidos. Apesar disso, Reinehr (2015) relata que a suplementação muitas vezes não leva ao aumento da produção de lipases, devido ao efeito de inibição por excesso de substrato, o que não foi constatado neste estudo.

Considerando a média de produção enzimática nas três concentrações do efluente, os consórcios C e D foram os que se destacaram com produção lipolítica específica média de 0,001129 U/ μ g e 0,001385 U/ μ g, respectivamente (Figura 2). Por isso foram selecionados para o planejamento experimental.

5.4 Determinação das melhores condições de produção enzimática

A matriz experimental completa esta apresentada no Quadro 2, juntamente com os rendimentos de lipase em U/ μ g dos consórcios C e D.

Quadro 2: Matriz do planejamento experimental completa com os resultados de produção enzimática obtidos em cada ensaio.

Ensaio	Variáveis e níveis			Atividade específica (U/ μ g)	
	pH	% Substrato	NH ₄ NO ₃	Consórcio C	Consórcio D
1	5	10	1g	0,00732	0,004758
2	9	10	1g	0,002846	0,002769
3	5	20	1g	0,006689	0,003867
4	9	20	1g	0,004808	0,003428
5	5	10	3g	0,006332	0,003424
6	9	10	3g	0,002549	0,002077
7	5	20	3g	0,005452	0,003882
8	9	20	3g	0,004264	0,002319
9	7	15	2g	0,007235	0,004401
10	7	15	2g	0,006977	0,004102
11	7	15	2g	0,007002	0,004425
12	7	15	2g	0,007104	0,004545

De modo geral, o consórcio C apresentou melhores rendimentos de lipase frente o consórcio D (Figura 3). De acordo com as condições experimentais, a maior concentração enzimática, 0,00732 U/ μ g, foi obtida pelo consórcio C nas condições de pH 5,0, concentração de substrato a 10% e 1g de NH₄NO₃, enquanto a mais baixa, 0,002077 U/ μ g,

foi detectada a partir do consórcio D nas condições de pH 9,0, concentração de substrato a 10% e 3g de NH_4NO_3 .

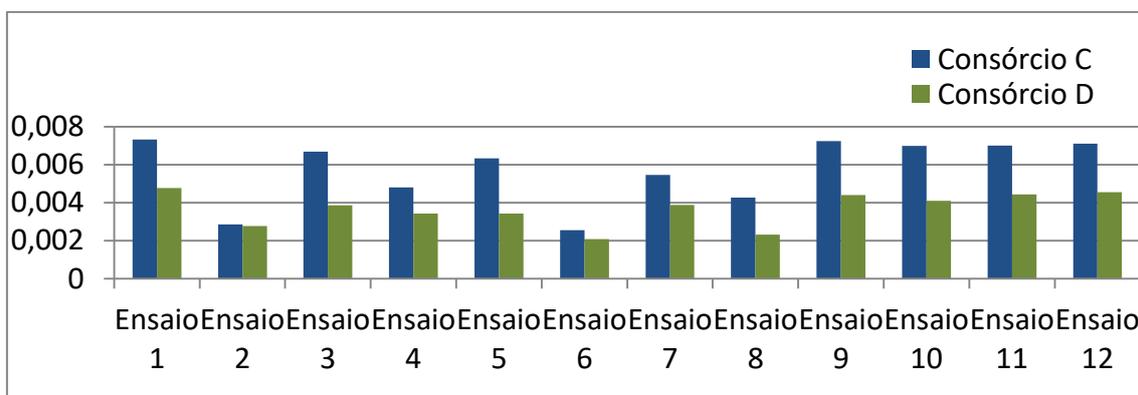


Figura 3: Rendimentos da produção de lipase, em U/μg, pelos consórcios C e D em cada ensaio do planejamento fatorial 2^3 .

A figura 4 mostra como a manipulação dessas variáveis influenciou a produção de lipase pelos consórcios.

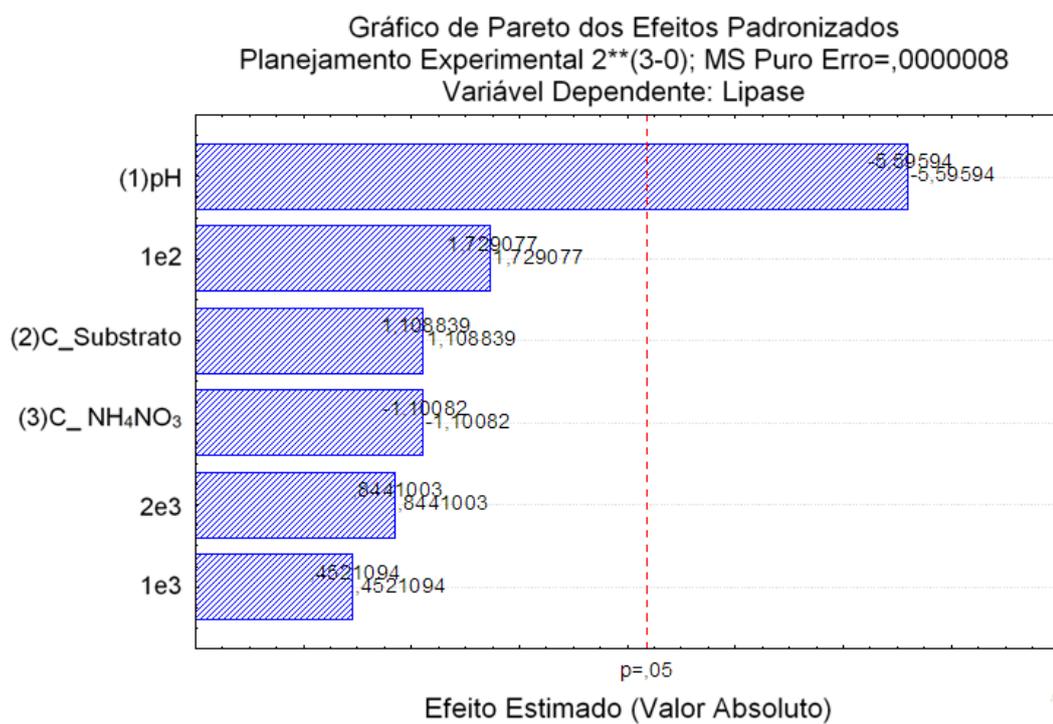


Figura 4: Efeito das variáveis sobre a produção lipolítica pelos consórcios C e D..

Esses dados revelam que o pH foi o único parâmetro estudado que exerceu algum efeito estatisticamente significativo sob a produção enzimática. O efeito do pH foi negativo

indicando que um aumento desta variável induziria uma diminuição da produção de lipase. Por outro lado, os parâmetros concentração de substrato, volume de NH_4NO_3 e as interações de todas as variáveis independentes não apresentaram efeito estatisticamente significativo na produção da lipase. Dessa forma verificou-se que as condições para se obter maior produção de lipase pelo consórcio C, dentre os valores estudados, são valores de pH na faixa de 5,0. Quanto às condições de concentração de substrato e volume de NH_4NO_3 foram mantidas respectivamente, 10% e 1g.

Esses resultados corroboram com Sales (2017) que relata que a faixa ideal de pH para produção de lipase está na faixa entre 4,0 - 7,0. Fleuri (2008) relata também que pH muito elevado pode diminuir a estabilidade da enzima. Porém, pH muito baixo também podem gerar resultados desagradáveis. Rigo (2009) obteve atividade hidrolítica menos expressiva em pH 4 quando comparada com a atividade quantificada em pH 7, na produção de lipase fúngica utilizando farelo de soja.

O fato do aumento no volume do NH_4NO_3 não ter influenciado significativamente para o rendimento da produção enzimática pelos consórcios, confirma o relato de Colla (2012) de que os melhores rendimentos em lipases são obtidos através de fontes orgânicas de nitrogênio, apesar de fontes inorgânicas, como os sais de amônio (sulfatos, fosfatos, cloretos), nitratos e nitritos, também serem utilizadas. Uma alternativa para isso seria o incremento da produção com peptona, água de maceração de milho, farinha de soja, torta de soja, aminoácidos, triptona, extrato de levedura, ureia ou outra fonte orgânica de nitrogênio.

5.5 Produção enzimática em biorreator

A maioria dos trabalhos científicos utilizam frascos erlenmeyers, mas para elevar a escala de produção de nível laboratorial para industrial foi analisada a produção enzimática em biorreator.

Os resultados obtidos pela produção enzimática nos biorreatores revelaram que nas condições testadas houve diferença no rendimento lipolítico (Figura 5).

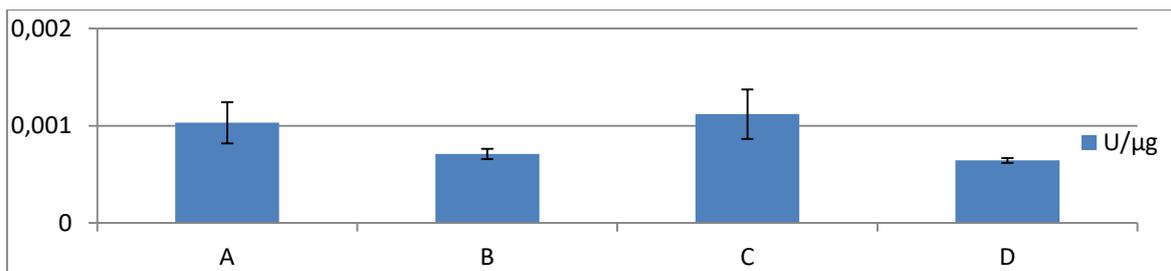


Figura 5: Produção enzimática nos biorreatores A (*Cunninghamella bertholletiae* e *C. echinulata*), B (*C. echinulata*), C (*C. bertholletiae*) e D (Controle Abiótico), em U/μg.

O biorreator C, inoculado apenas com *Cunninghamella bertholletiae* teve o melhor rendimento de produção, 0,00112 U/ml, enquanto o biorreator B, inoculado apenas com *C. echinulata* teve o menor rendimento, 0,000711 U/ml, e o biorreator A, inoculado com o consórcio micobiano: *C. bertholletiae* e *C. echinulata* teve rendimento intermediário, 0,001031 U/ml.

O maior rendimento enzimático obtido por *C. bertholletiae* em biorreator pode ter resultado do modelo e configurações do biorreator utilizadas para o ensaio. Segundo Thakur (2012), o alto rendimento enzimático depende não apenas da escolha dos micro-organismos adequados, dos substratos utilizados e análise de como as variáveis afetam o desempenho, mas também da escolha da configuração do biorreator, utilizado no processo. Martins et al, (2008) relata que até mesmo a geometria do biorreator influencia a produção de lipases.

Devido à atividade lipolítica superior em biorreator, o extrato enzimático produzido por *C. bertholletiae* foi selecionado para realização dos testes cinéticos.

5.6 Cinética de atividade enzimática

Determinação das melhores temperaturas e pH para reação

Nas condições estudadas a lipase de *C. bertholletiae* em extrato bruto apresentou uma maior atividade em pH 8,0 como pode ser observado na Figura 6.

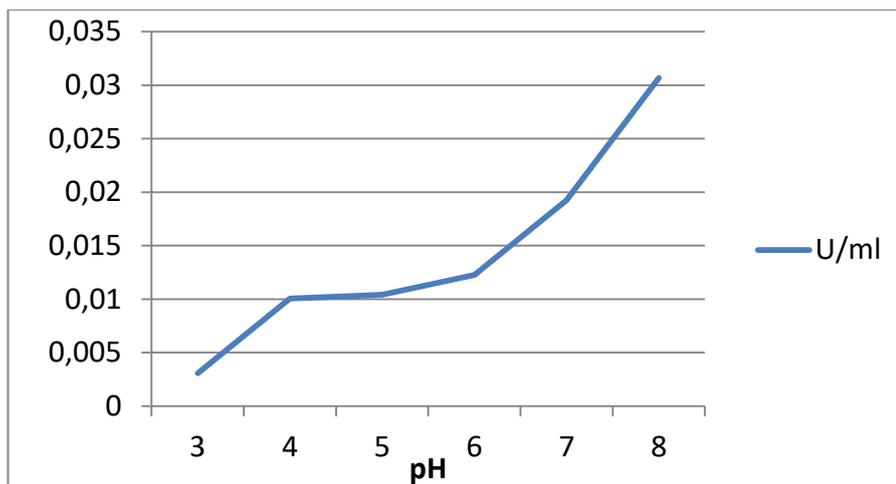


Figura 6: Efeito do pH na atividade do extrato bruto produzido por *C. bertholletiae*.

A temperatura ótima para lipase bruta estudada nas condições do experimento é 40 °C, conforme demonstrado na figura 7.

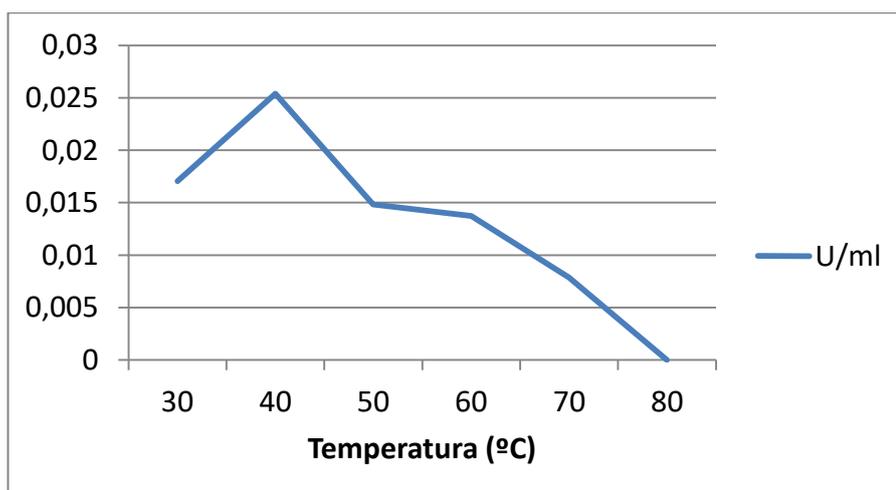


Figura 7: Efeito da temperatura na atividade do extrato bruto produzido por *C. bertholletiae*.

Resultados semelhantes foram obtidos por Sharma et al (2017), em que alto níveis de atividade da lipase de *Cunninghamella sp.* foi encontrado a 37 °C e pH 9,0.

Determinação da estabilidade térmica

O Extrato enzimático bruto apresentou certa estabilidade a 40 °C por até 60 min. Depois disso a atividade lipolítica foi diminuída drasticamente. A figura 8 mostra o efeito do tempo de incubação a 40 °C sobre a atividade enzimática.

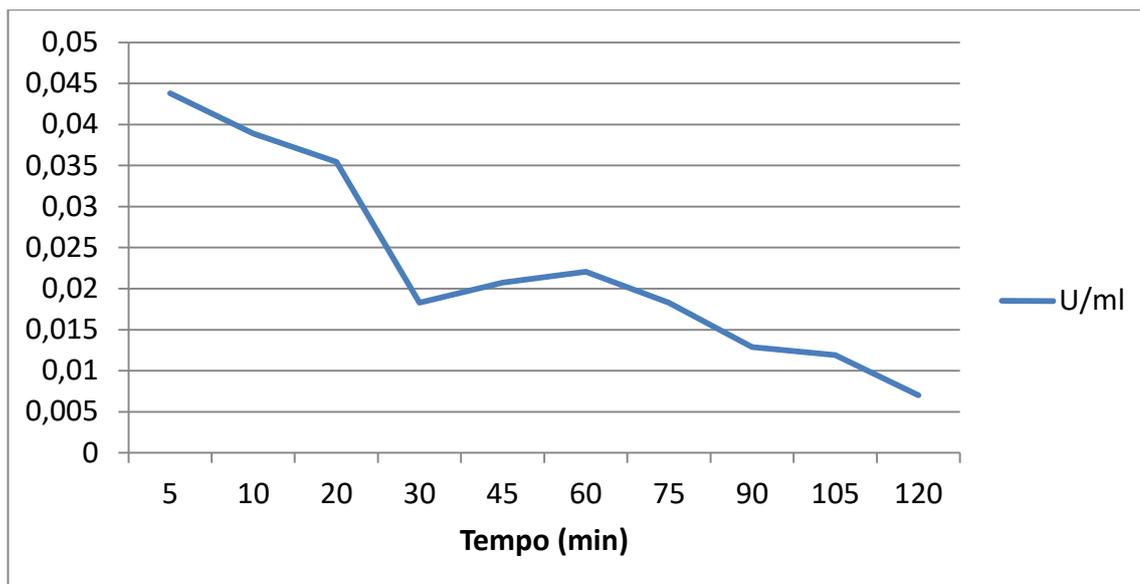


Figura 8: Atividade enzimática relativa em função do tempo de incubação a 40° C, em U/ μ g.

Estabilidade em diferentes valores de pH

O efeito dos diferentes valores de pH sobre a atividade enzimática está apresentado na Figura 9.

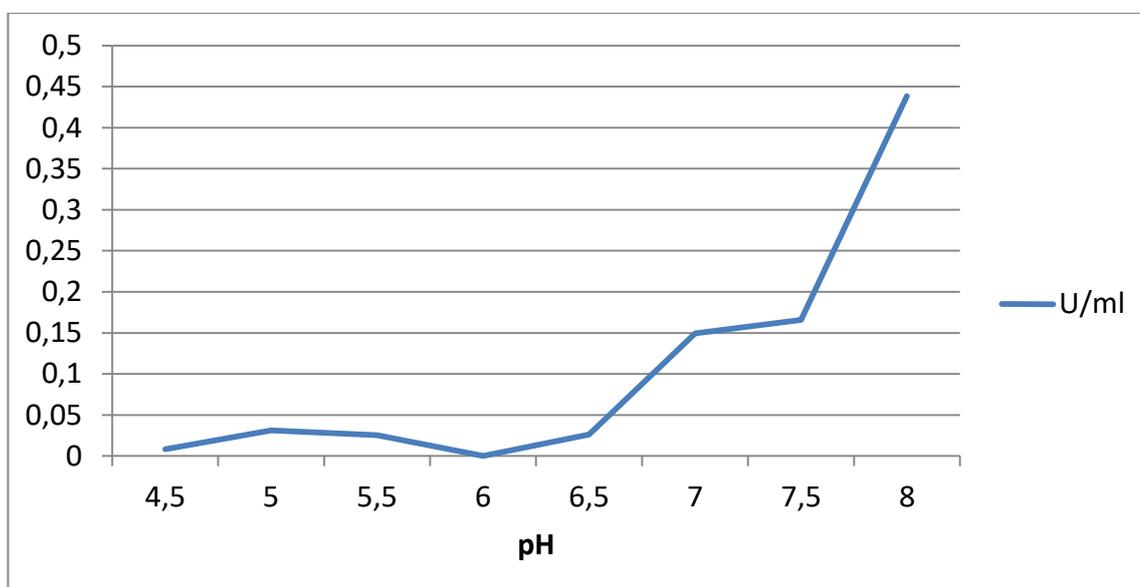


Figura 9: Atividade enzimática relativa em função da incubação a diferentes valores de pH, em U/ μ g.

Como pode ser observado, a lipase bruta de *C. bertholletiae* se mostrou mais estável em valores de pH acima de 8.

Knob et al. (2015) verificou maior estabilidade enzimática de lipase produzida por *Penicilium sp.*, em pH entre 7 e 10, também obtendo uma máxima atividade de lipase em pH 8.

5.7 Toxicidade de subprodutos formados

A Figura 10 mostra os índices de germinação obtidos no teste de Fitotoxicidade.

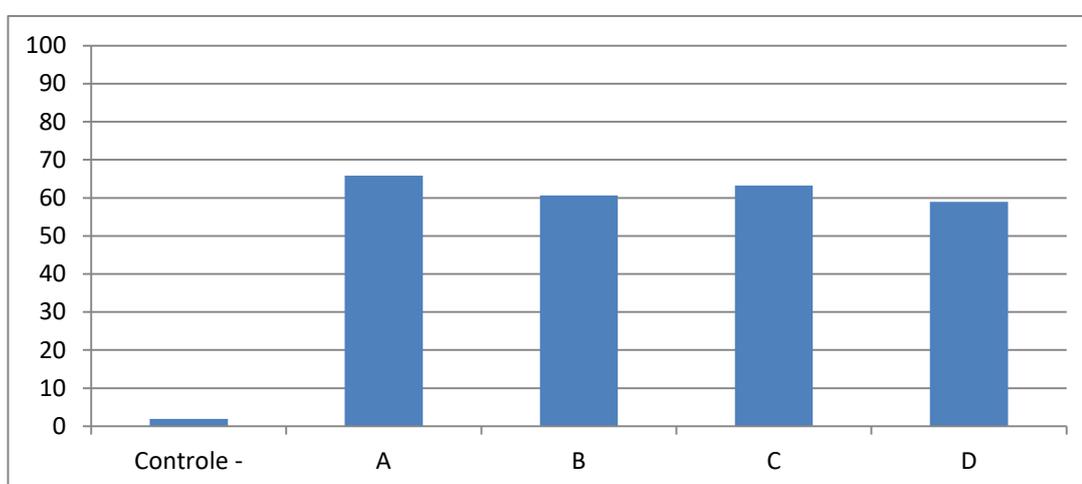


Figura 10: Índice de germinação (IG%) das sementes de *Cucumis sativus* crescidas com o líquido metabólico dos biorreatores A, B, C e D.

Os resultados demonstram índices de germinação satisfatórios obtidos pelos biorreatores, entre 58,9% e 65,8%. Sendo o maior índice de germinação proveniente do biorreator com o consórcio fúngico.

Arruda (2011) avaliou a biodegradação de óleo diesel por *Cunninghamella sp.*, *Aspergillus sp.* e *Penicilium sp.*, e observou que nas maiores concentração de óleo testadas, 9% e 11%, *Cunninghamella sp.* foi o que apresentou índices de germinação mais satisfatórios no teste de fitotoxicidade, acima de 50% e % 45,72%, respectivamente.

5.8 Composição centesimal de biomassa fúngica residual

Durante o processo fermentativo em frascos erlenmeyer, 32 g de biomassa residual fúngica foi produzida. A composição centesimal da amostra integral e a estimativa da amostra seca são descritas na Tabela 2 e representadas na figura 10.

Tabela 2: Composição centesimal da biomassa residual fúngica.

Parâmetros	Biomassa Úmida (%)	Biomassa Seca (%)
Umidade	68,32 ± 0,02	
Cinzas	0,65 ± 0,006	2,0683
Proteína	3,77 ± 0,06	11,916
Lipídios	21,59 ± 1,02	68,166
Carboidrato	5,65475	17,8495

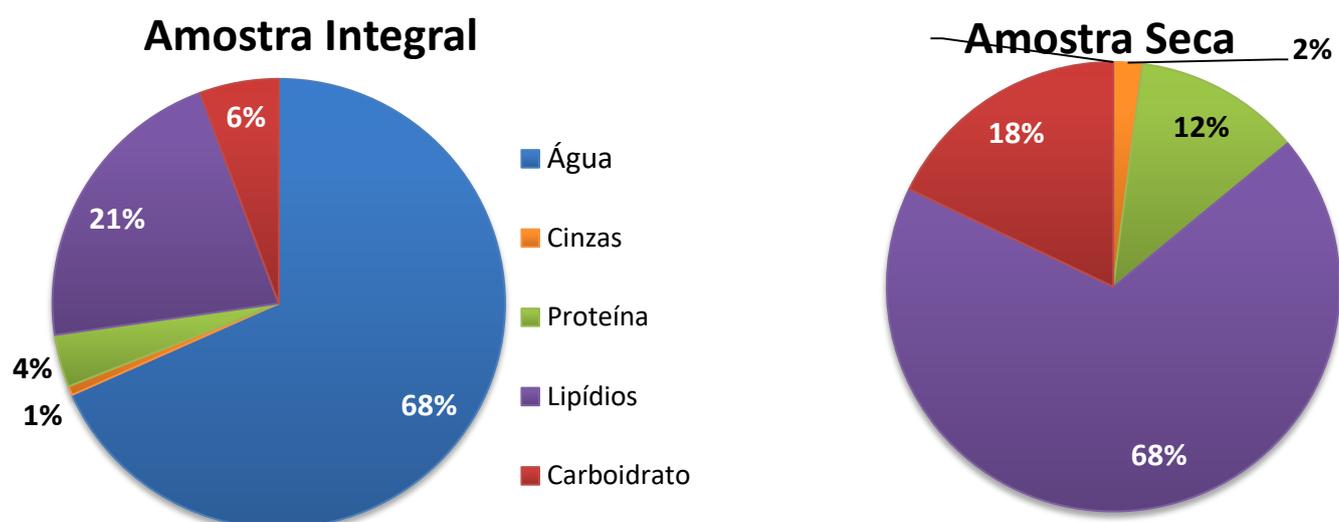


Figura 11: Composição centesimal da biomassa residual fúngica.

Biomassa residual microbiana tem sido investigadas a fim de serem destinadas e aproveitadas de forma rentável. Oliveira et al, (2010) investigou a composição centesimal da biomassa microbiana produzida em efluente de indústria de abate e processamento de tilápias, pela bactéria *Rubrivivax gelatinosus*, obtendo 57% de proteínas, 23% de carboidratos, 11% de lipídeos, 5% de umidade e 4% de cinzas, podendo encontrar

aplicação como ingrediente de rações para animais, pelo elevado teor proteico e energéticos. Com base nisso, a biomassa fúngica obtida neste estudo também poderia ser utilizada como ingrediente de ração animal, considerando sua composição centesimal com elevada concentração de lipídio, carboidrato e proteína, e conseqüentemente elevado teor energético.

Sousa et al, (2019) avaliou a inclusão de biomassa seca de *A. niger* na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em rações extrusadas, e com base em seus resultados, a utilização de biomassa seca de fungo pode trazer benefícios ao organismo que está sendo cultivado, pode auxiliar na redução de custos de fabricação e ajudar ainda mais a viabilidade dos cultivos.

6. CONCLUSÕES

C. bertholletiae (URM 7658) apresentou maior atividade lipolítica que as demais cepas analisadas, com 0,591 U/ml.

Dentre as variáveis testadas no planejamento fatorial, o pH foi o único parâmetro que exerceu efeito estatisticamente significativo sob a produção enzimática, sendo negativo. Enquanto a concentração de substrato, volume de NH_4NO_3 e as interações das variáveis independentes não apresentaram efeito significativo.

Apesar dos resultados de atividade lipolítica obtidos não terem sido muito expressivos, eles sugerem ajustes no modelo para produção de lipases pelas linhagens estudadas e fornecem informações sobre o crescimento e fisiologia delas e dados para um planejamento mais amplo com maior número de fatores.

A lipase bruta de *C. bertholletiae* se mostrou mais estável a 40 °C por até 60 min e em valores de pH acima de 8.

Os testes de fito-toxicidade revelaram a eficiência das linhagens na diminuição da toxicidade do efluente utilizado.

A biomassa residual gerada nos processos fermentativos apresentou elevado teor energético, podendo encontrar aplicação como ingrediente de rações para animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelmoez, W., Mostafa, N. A., Mustafa, A. 2013. Utilization of oleochemical industry residues as substrates for lipase production for enzymatic sunflower oil hydrolysis. *Journal of cleaner production*, 59, 290-297.
- Abdullah, R.; Akram, S.; Iqtedar, M.; Kaleem, A.; Saleem, F.; Iftikhar, T. Application of synergistic phenomena for enhanced production of xylanase using fungal consortium under submerged fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol. 18, No. 3 (2019) 1223-1232.
- Abrunhosa, L., Oliveira, F., Dantas, D., Gonçalves, C., Belo, I. 2013. Lipase production by *Aspergillus ibericus* using olive mill wastewater. *Bioprocess Biosyst Eng* 36: 285–291.
- Araújo, m. L. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas. 2013. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.
- Arruda, F. V. F. Degradação de óleo diesel por *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*. 2011. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Bradford, M.M. 1976. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bogdanova, L. R., Bakirova, D. R., Valiullina, Y. A., Idiyatullin, B. Z., Faizullin, D. A., Zueva, O. S., Zuev, Y. F. 2016. The structure and activity of fungal lipases in bile-salt solutions. *Biophysics*, 61(2), 207-212.
- Borrelli, G., Trono, D. 2015. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 20774-20840.
- Cai, H., Zhang, T, Zhao, M, Mao, J, Cai, C., Feng, F. 2017. Co-expression of lipase isozymes for enhanced expression in *Pichia pastoris*. *Letters in Applied Microbiology* 65 (4): 335-342.
- Carvalho, A. K. F. 2015. *Avaliação do potencial do fungo filamentososo Mucor circinelloides como fonte de lipase e lipídios para a produção de biodiesel dentro do conceito de biorrefinaria*. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

- Colla, L. M., Reinehr, C. O., Costa, J. A. V. 2012. Aplicações e produção de lipases microbianas. *Revista CIATEC-UPF*, 4(2), 1-14.
- Cortez, D. V., de Castro, H. F., Andrade, G. S. 2017. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. *Química Nova*, 40(1), 85-96.
- Cruz, G. G. 2017. Tratamento Biológico De Óleo Diesel Por Consórcio Fúngico. Tese (Doutorado) - Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco.
- Duarte, A. W. F., dos Santos, J. A., Vianna, M. V., Vieira, J. M. F., Mallagutti, V. H., Inforsato, F. J., Pessoa Junior, A., *et al.* 2018. Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. *Critical reviews in biotechnology*, 38(4), 600-619.
- Feitosa, I. C.; Barbosa, J. M. P.; Orellana, S. C.; Lima, A. S.; Soares, C. M. F. Produção de lipase por meio de micro-organismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. *Acta Scientiarum Technology*, v. 32, n. 1, p. 27-31, 2010.
- Fernandes, R. D. 2017. Otimização da produção de lignina peroxidase por consórcio fúngico através da fermentação semissólida de bagaço de cana-de-açúcar. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências (Campus de Rio Claro), 2017
- Fleuri, L. F., & Sato, H. H. 2008. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. *Food Science and Technology (Campinas)*.
- Geoffry, K., & Achur, R. N. 2017. A novel halophilic extracellular lipase with both hydrolytic and synthetic activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 125-130.
- Geoffry, K., Achur, R. N. 2018. Screening and production of lipase from fungal organisms. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.
- Gopinath, S. C., Anbu, P., Lakshmipriya, T., Hilda, A. 2013. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed Research International*, 2013.
- Gupta, R., Kumari, A., Syal, P., Singh, Y. 2015. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in lipid research*, 57, 40-54.
- Ichikawa, T.; Ishikura, T.; Osaki, A. Improvement of Kasugamicin-producing strain by the agar piece method and phototroph method. *Folia Microbiologica* 16: p. 218-224. 1971.

- Jesus, M. V., Oliveira, T. S., Ferreira, R. D. M., Lima, A. M., Rodrigues, J. R. S., Silva, C. F., Souza, R. R. 2016. Produção de lipase utilizando manipueira como fonte alternativa de carbono. *Scientia Plena* 12 (5).
- Kapoor, M., Gupta, M. N. 2012. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47(4), 555-569.
- Karigar, C. S., Rao, S. S. 2011. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme research*, 2011.
- Kiran, S., Arshad, Z., Nosheen, S., Kamal, S., Gulzar, T., Majeed, M. S., Rafique, M. A. 2016. Microbial Lipases: Production and Applications: A Review. *Journal of Biochemistry Biotechnology and Biomaterials*, 1(2), 7-20.
- Knob, A., Tombini, J., da Cunha, M. A. A., & de Lima, V. A. (2015). Caracterização Bioquímica de Lipase Obtida por Fermentação do Farelo de Soja em Cultivo em Meio Sólido. *Blucher Biochemistry Proceedings*, 1(2), 367-367.
- Ladeira, S.A., Andrade, M.V.V., Delatorre, A.B., Perez, V.H., Martins, M.L.L. (2010) Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus sp.* em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Revista Química Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-5.
- Lai, O. M., Lee, Y. Y., Phuah, E. T., Akoh, C. C. 2018. Lipase/Esterase: Properties and Industrial Applications. In: *Reference Module in Food Science*, 2018. 10.1016/B978-0-08-100596-5.21640-5.
- Lopes, M. S. Práticas de gerenciamento aplicadas à resíduos químicos em laboratório de ensino e pesquisa no município de Caçapava do Sul – RS. Universidade Federal do Pampa, 2018.
- Mahmoud, G. A. E., Koutb, M. M., Morsy, F. M., Bagy, M. M. 2015. Characterization of lipase enzyme produced by hydrocarbons utilizing fungus *Aspergillus terreus*. *European Journal of Biological Research*, 5(3), 70-77.
- Marotti, B. S., Cortez, D. V., Gonçalves, D. B., Castro, H. F. 2017. Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. *Quim. Nova*, 40(4), 427-435.
- Mehta, A., Bodh, U., Gupta, R. 2017. Fungal lipases: a review. *Journal of Biotech Research*, 8.
- Messias, J. M., Costa, B. Z. D., Nascimento, V. M. G. D., Giese, E. C., Dekker, R. F., Barbosa, A. D. M. 2011. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina. Ciências Exatas e Tecnológicas*, 213-234.

- Narasimhan, V., Bhimba, V. 2015. Screening of extracellular lipase releasing microorganisms isolated from sunflower vegetable oil contaminated soil for bio-diesel production. *Asian J Pharm Clin Res*, 8(2), 427-430.
- Nascimento, C. S., SANTOS, V. D., Andrade, M. H. C. 2014. Análise da produção de protease e lipase por fungos Filamentosos isolados do fruto da macaúba (*Acrocomia aculeata* (jacq) lood. Ex mart). In *XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ)*.
- Nwuche, C. O., Ogonna, J. C. 2011. Isolation of lipase producing fungi from palm oil mill effluent (POME) dump sites at Nsukka. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(1), 113-116.
- Oliveira, G. D., Torres, A. P. C., Grassi, T. L. M., Santo, E. F. D. E., Lima, L. K. F. D., & Ponsano, E. H. G. (2010). Composição centesimal de biomassa bacteriana produzida em efluente industrial. *Veterinária e Zootecnia*, 138-138.
- Oliveira, A. C. D., Vargas, J. V. C., Rodrigues, M. L. F., Mariano, A. B. 2013. Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.15, n.1, p.19-26.
- Orlandelli, R. C., Specian, V., Felber, A. C., Pamphile, J. A. 2012. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 7(3).
- Pandey, H., Kestwal, A., Chauhan, D., Kumari, S., Dhalwal, V., Singh, G. J., Kapoor, A., *et al.* 2015. Isolation and screening of potential fungi and standardization of a process for the production of extracellular lipase. *DU Journal of Undergraduate Research and Innovation*, 1(1), 116-123.
- Patil, K. J., Chopda, M. Z., Mahajan, R. T. 2011. Lipase biodiversity. *Indian Journal of Science and Technology*, 4(8), 971-982.
- Piscitelli, A., Tarallo, V., Guarino, L., Sannia, G., Birolo, L., Pezzella, C. 2017. New lipases by mining of *Pleurotus ostreatus* genome. *PloS one*, 12(9), e0185377.
- Ramos-Sánchez, L. B., Cujilema-Quitio, M. C., Julian-Ricardo, M. C., Cordova, J., Fickers, P. 2015. Fungal lipase production by solid-state fermentation. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 5(2), 1.
- Ray, S. 2015. Applications of extracellular microbial lipase—A review. *Int J Res Biotechnol Biochem*, 5(1), 6-12.
- REINEHR, C. O. Produção de lipases de *Aspergillus* spp. por fermentação em estado sólido seguida de separação e concentração utilizando membranas. (Tese de

- Doutorado). Universidade Regional Integrada Do Alto Uruguai E Das Missões, Erechim, Rs, 2015.
- Rigo, E. Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2009
- Rihani, A., Tichati, L., Soumati, B. 2018. Isolation and identification of lipase-producing fungi from local olive oil manufacture in east of Algeria. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 19(1), 13-22.
- Rodrigues, C. 2015. Crescimento e atividade lipolítica de fungos de espuma de caixa de gordura em fermentação submersa e em estado sólido. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.21; p. 3078.
- Rodrigues, C., Cassini, S. T., Antunes, P. W., Keller, R. P., Gonçalves, R. F. 2016. Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases com base na atividade lipásica e no potencial hidrolítico sobre óleo comestível de soja e espuma de caixa de gordura. *Eng. sanit. ambient*, 21(3), 507-518.
- Roveda, Mirela; Hemkemeier, Marcelo; Colla, Luciane Maria. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de micro-organismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 30, n. 1, p. 126-131, Mar. 2010. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612010000100019&lng=en&nrm=iso>. access on 18 Jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000100019>.
- Sahay, S., Chouhan, D. 2018. Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.
- Salgado, J. M.; Abrunhosa, L.; Venâncio, A.; Domínguez, J. M.; Belo, I., Combined bioremediation and enzyme production by *Aspergillus* sp. in olive mill and winery wastewaters. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110, 16-23, 2016.
- Sales, J. C. S.; CASTRO, A. M.; RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z. Supplementation of watermelon peels as an enhancer of lipase and esterase production by *Yarrowia lipolytica* in solidstate fermentation and their potential use as biocatalysts in poly(ethylene terephthalate) (PET) depolymerization reactions. *Biocatalysis and Biotransformation*, Volume 38, 2020 - Issue 6. p. 1-12, 2020.

- Sales, P. S. C. 2017. Produção de lipase por amostras de *Cunninghamella echinulata* (UCP 1308) em meios contendo resíduos agroindustriais. 2017. 74 f. Dissertação(Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2017.
- Shao, H., Xu, L., Yan, Y. 2014. Biochemical characterization of a carboxylesterase from the archaeon *Pyrobaculum* sp. 1860 and a rational explanation of its substrate specificity and thermostability. *International journal of molecular sciences*, 15(9), 16885-16910.
- Sharma, A. K., Sharma, V., & Saxena, J. 2016. A Review Paper on Properties of Fungal Lipases. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 5(12), 123-130.
- Sharma, D., Sharma, B., & Shukla, A. K. 2011. Biotechnological approach of microbial lipase: a review. *Biotechnology*, 10(1), 23-40.
- Shelatkar, T., Padalia, U., Student, P. 2016. Lipase: An Overview and its Industrial Applications. *Int J Eng Sci*, 6(10), 2629-2631.
- Singh, A. K., Mukhopadhyay, M. 2012. Overview of fungal lipase: a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(2), 486-520.
- Solarte, C., Yara-Varón, E., Eras, J., Torres, M., Balcells, M., Canela-Garayoa, R. 2014. Lipase activity and enantioselectivity of whole cells from a wild-type *Aspergillus flavus* strain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 100, 78-83.
- Sousa, A. A., Emerenciano, M. G. C., Durigon, E. G., & de Mello, G. L. (2019). Biomassa seca de *Aspergillus niger* em rações extrusadas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Agrarian*, 12(45), 367-374.
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., James, T. Y. *et al.* 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028-1046.
- Sperb, J. G. C., Costa, T. M., Vaz, D. A., Valle, J. A. B., Valle, R. D. C. S. C., Tavares, L. B. B. 2015. Análise qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. *Engevista*, 17(3), 385-397.
- Tedersoo, L., Sánchez-Ramírez, S., Kõljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., Abarenkov, K. *et al.* 2018. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*, 90(1), 135-159.
- Thakur, S. 2012. Lipases, its sources, properties and applications: a review. *Int J Sci Eng Res*, 3(7), 1-29.

- Tiquia, S. M., Tam, N. F. Y. & Hodgkiss. I. J., 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environ. Pollut.*, 93, 249-256
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., Oliveira, J. V. 2010. A review on microbial lipases production. *Food and bioprocess technology*, 3(2), 182-196.
- Verma, N., Thakur, S., Bhatt, A. K. 2012. Microbial lipases: industrial applications and properties (a review). *Int Res J Biol Sci*, 1(8), 88-92.
- Wadia, T., Jain, K. S. 2017. Isolation, screening and identification of lipase producing fungi from oil contaminated soil of Shani Mandir Ujjain. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6(7), 1872-1878.
- Winkler, U. K.; Stuckmann, M. 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, v. 138, n.3, p. 663-670