



UFSJ
UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SÃO JOÃO DEL-REI

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA - CAP
BACHARELADO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS**

**BIOPROSPECÇÃO E PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA
UTILIZANDO ÓLEO DE COZINHA USADO COMO INDUTOR**

José Damas Silva

Orientadora: Prof.^a M.^a Katialaine Corrêa de Araújo

**Ouro Branco
Abril de 2018**

BIOPROSPECÇÃO E PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO ÓLEO DE COZINHA USADO COMO INDUTOR

José Damas Silva

Trabalho de Conclusão de curso
apresentado em cumprimento às
exigências do Bacharelado em Engenharia
de Bioprocessos da Universidade Federal
de São João Del-Rei Campus Alto
Paraopeba.

Orientadora: Prof.^a M.^a Katialaine Corrêa de Araújo

Ouro Branco
Abril de 2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA - CAP
BACHARELADO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS**

**BIOPROSPECÇÃO E PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA
UTILIZANDO ÓLEO DE COZINHA USADO COMO INDUTOR**

José Damas Silva

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Prof.^a M.^a Katialaine Corrêa de Araújo (Orientadora)

Prof. Dr. Boutros Sarrouh (Avaliador)

Prof. Me. Gabriel de Castro Fonseca (Avaliador)

Ouro Branco, ____/____/____.

AGRADECIMENTOS

Neste momento é necessário expressar meus agradecimentos e gratidão para aqueles que contribuíram nessa caminhada.

Agradeço primeiramente a Deus e meus pais que são a base que me sustentam.

Agradeço a minha orientadora por todo auxílio e paciência.

Agradeço aos técnicos de laboratório Priscila e Wesley por toda ajuda nos experimentos.

Agradeço ao meu amigo Igor por toda ajuda ao longo do trabalho.

“A vida depende de uma bem orquestrada série de reações químicas. Muitas delas, entretanto, ocorrem muito lentamente para manter os processos vitais. Para resolver esse problema, a natureza planejou um modo de acelerar a velocidade das reações químicas por meio da catálise. As reações catalíticas são executadas por enzimas que facilitam os processos vitais em todas as suas formas, desde os vírus até os mamíferos superiores”

MOTTA, 2006.

RESUMO

Lipases são enzimas que atuam na interface água e óleo catalisando a hidrólise de triglicerídeos, podendo também atuar em baixas concentrações de água em reações de esterificação, transesterificação e interesterificação. Devido à ampla quantidade de reações catalisadas, as lipases podem ser aplicadas em variadas atividades industriais e biotecnológicas. As lipases de origem microbiana são as que apresentam maior interesse industrial. O objetivo deste estudo foi realizar a bioprospecção de microrganismo produtor de lipase extracelular e a produção da enzima em fermentação submersa utilizando óleo de cozinha usado como indutor. A bioprospecção foi feita em diferentes amostras: espuma de caixa de gordura do restaurante universitário da Universidade Federal de São João del-Rei Campus Alto Paraopeba, solo contaminado com óleo lubrificante (20° 28' 3,367" S e 43° 50' 58,405" W), amostras de solo de raiz de bambu (20° 28' 1,967" S e 43° 50' 57,852" W, 20° 28' 1,703" S e 43° 50' 57,911" W), abacate em decomposição, manteiga mofada e banha de galinha deteriorada. As amostras foram inoculadas em meio YMA, isolou-se treze microrganismos com diferentes características morfológicas macroscópicas, sendo que destes, nove apresentam resultado positivo em meio seletivo para atividade lipolítica. Por meio do índice enzimático em meio sólido e método titulométrico para determinação de atividade enzimática do extrato bruto, um microrganismo foi selecionado para uma fermentação por 120 horas utilizando como substrato alternativo óleo de cozinha usado e como controle o Tween® 80. Utilizando o óleo de cozinha usado foi obtido maior atividade enzimática de $0,100 \pm 0,002$ U/mL, enquanto usando Tween® 80 $0,080 \pm 0,002$ U/mL.

Palavras chaves: Bioprospecção; Lipases; Microrganismos; Fermentação Submersa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxo de atividades de pesquisa em bioprospecção/biotecnologia envolvendo diferentes setores modernos da biologia molecular que propiciam o desenvolvimento de novos bioprodutos.....pág. 16

Figura 2: Comportamento catalítico das lipases e esterases, onde CM é a concentração micelar. Fonte: PADILHA, 2010.....pág. 22

Figura 3: Exemplos de algumas reações catalisadas pelas lipases. Hidrólise é a reação que ocorre na presença da interface água/óleo. Alcoólise é a reação de transferência de um grupo acila entre um acilglicerol e um álcool. Glicólise é a reação de interesterificação de um triacilglicerol com um glicerol. Acidólise é a transferência de um grupo acil entre um acilglicerol e um ácido carboxílico. Transesterificação é a troca de um grupo acil entre gliceróis. Fonte: CORTEZ *et al.*, 2017.....pág. 24

Figura 4: Fluxograma simplificado da produção de enzimas microbianas utilizando o processo de fermentação submersa. Fonte: Adaptado de ORLANDELLI *et al.*, 2012.....pág. 33

Figura 5: Algumas das aplicações industriais das lipases. Fonte: CORTEZ *et al.*, 2017.....pág. 35

Figura 6: Microrganismos que cresceram no meio YMA após 96 horas de incubação das amostras. Placa 1 inoculada com abacate em deposição. Placa 2 inoculada com banha de galinha deteriorada. Placa 3 inoculada com manteiga mofada. Placa 4 inoculada com espuma da caixa de gordura. Placa 5 inoculada com solo de raiz de bambu (20° 28' 1,967" S e 43° 50' 57,852" W). Placa 6 inoculada com solo contaminado com óleo lubrificante (20° 28' 3,367" S e 43° 50' 58,405" W). Placa 7 inoculada com solo de raiz de bambu (20° 28' 1,703" S e 43° 50' 57,911" W). Fonte: Autor.....pág. 42

Figura 7: Microrganismos que apresentaram resultado positivo para produção de lipase em meio sólido observados em luz ultravioleta (350 nm). Em 1 o microrganismo 1RA, 2 o microrganismo 1RSCIII, 3 o microrganismo 1RSBI, 4 o microrganismo 1RSCG, 5 o microrganismo 1RSCI, 6 o microrganismo 1RSCII, 7 o microrganismo 1RSBIII, 8 o microrganismo 1RSBII e 9 o microrganismo 2RSC.....pág. 44

Figura 8: Halo de degradação de lipase extracelular do microrganismo 2RSBII quando observado em luz ultravioleta (350 nm) em meio de cultivo com rodamina B. Fonte: Autor.....pág. 45

Figura 9: Mudança de coloração de toda superfície do microrganismo 2RSC quando observado em luz ultravioleta (350 nm) em meio de cultivo com rodamina B. Fonte: Autor.....pág. 45

Figura 10: Ausência de halo de degradação do redor da colônia e fluorescência da colônia do microrganismo 1RSBIII quando observado em luz ultravioleta (350 nm) em meio de cultivo com rodamina B. Fonte: Autor.....pág. 46

Figura 11: Índice enzimático dos microrganismos que apresentaram resultado positivo no teste no meio seletivo quanto atividade lipolítica. Fonte: Autor.....pág. 47

Figura 12: Atividade enzimática dos três microrganismos (1RSBII, 1RSCII, 2RSCI) com maior índice enzimático após 96 horas de fermentação submersa. Fonte: Autor.....pág. 48

Figura 13: Atividade enzimática ao longo das 120 horas de fermentação submersa utilizando como indutor óleo de cozinha usado e Tween® 80 para o microrganismo 1RSBII. Fonte: Autor.....pág. 49

Figura 14: Resultado da microscopia óptica em aumento de 400X do microrganismo denominado como 1RSBII, que se trata de um bacilo Gram-negativo. Fonte: Autor.....pág. 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação internacional das enzimas.....pág. 20

Tabela 2: Microrganismos produtores e fornecedores de lipases comerciais...pág. 29

Tabela 3: Alguns resíduos da agroindústria utilizados por vários microrganismos para a produção de lipase.....pág. 32

Tabela 4: Comparações entre a fermentação submersa e em estado sólido...pág. 34

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	13
2 – OBJETIVOS	15
2.1 – Objetivos gerais.....	15
2.2 – Objetivos específicos.....	15
3 – REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 – Bioprospecção	16
3.2 – Enzimas	18
3.3 – Lipase.....	22
3.4 – Lipases microbianas	27
3.5 – Produção industrial	29
3.6 – Fermentação submersa	33
3.7 – Aplicações tecnológicas.....	36
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 – Bioprospecção do microrganismo	38
4.2 – Seleção quanto atividade lipolítica	38
4.3 – Determinação da atividade enzimática em meio sólido.....	39
4.4 – Determinação do microrganismo com maior atividade lipásica	39
4.5 – Fermentação submersa	40
4.6 - Sistematização e nomenclatura dos microrganismos	41
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 – Cultivo e isolamentos microrganismo	42
5.2 – Seleção de microrganismos produtores de lipase.....	43
5.3 – Atividade lipolítica	47

6 – CONCLUSÃO	51
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 – INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores biológicos responsáveis pela aceleração de reações químicas do metabolismo. Podem ser produzidas em escala industrial para serem utilizadas em variados processos substituindo a catálise química devida sua alta especificidade e ausência de reações secundárias indesejadas (CORTEZ *et al.*, 2017; FERNANDES, 2009).

Produzidas por animais, vegetais e microrganismos, as lipases (glicerol éster hidrolase, E.C.3.1.1.3) são um dos grupos de enzimas mais utilizadas como biocatalizadores em vários ramos e atividades industriais (TREICHEL *et al.*, 2010). As lipases atuam em uma grande gama de reações como a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis fornecendo diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos. A maioria das lipases encontradas no mercado é produzida em fermentação submersa por fungos filamentosos devido a sua alta produtividade e pela enzima ser extracelular o que facilita o processo de purificação (COLLA *et al.*, 2012).

As lipases de origem microbiana podem ser produzidas por fermentação em estado sólido ou por fermentação submersa, a primeira é caracterizada principalmente por utilizar algum material sólido que pode ser inerte ou não como substrato com umidade reduzida e controlada, já na fermentação submersa ocorre em meio de cultivo líquido com os microrganismos em suspensão, sendo este um método que facilita o processo de separação e purificação da molécula alvo (KILIKIAN & PESSOA, 2005; VECCHIA *et al.*, 2004).

O mercado global de enzimas industriais movimentou em 2016 US\$ 5 bilhões, sendo que as lipases e esterases representam cerca de 10% desse mercado, ficando atrás das carboidrases e proteases. Estima-se que esse mercado global cresça de 6 a 8% nos próximos anos, atingindo cerca de US\$ 7 bilhões em 2020, o que reforça como a produção industrial de enzimas é um mercado em crescente expansão e de impacto na economia (LAI *et al.*, 2018).

Devido às variadas aplicações e ao mercado movimentado pelas enzimas, torna-se necessário a bioprospecção de novos produtores. Define-se como

bioprospecção à busca sistemática por microrganismos ou produtos de seu metabolismo, genes e proteínas que possam ser utilizados na geração de produtos de valor agregado. As técnicas de bioprospecção podem ser das mais simples, como a clássica bioprospeccção de microrganismos cultiváveis que apresentem características desejáveis, e que podem ser encontrados em variados habitats ou modernas, e caras incluindo a engenharia de proteínas (FILHO *et al.*, 2014; SOARES, 2016).

Apesar do promissor uso e suas várias aplicações industriais, a produção de lipases ainda é limitada pelo seu custo de produção e operação, sendo o substrato um fator que contribui para o encarecimento do processo. Deste modo, este trabalho buscou bioprospectar um microrganismo produtor de lipase e estabelecer um processo produtivo adotando um meio de cultivo alternativo e barato facilmente encontrado que é o óleo de cozinha que após sucessiva utilização é descartado muitas vezes de maneira incorreta poluindo lençóis freáticos e corpos d'água, mas que pode ser utilizado por microrganismos para a produção de enzimas.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivos gerais

Bioprospecção, seleção de microrganismo e produção de lipase por fermentação submersa utilizando como substrato óleo de cozinha usado.

2.2 – Objetivos específicos

- i. Isolamento de microrganismos de diferentes fontes;
- ii. Teste qualitativo em meio sólido para seleção de produtores de lipase;
- iii. Teste quantitativo para produção da enzima e determinação do melhor produtor em fermentação submersa;
- iv. Produção de lipase em fermentação submersa utilizando óleo de cozinha usado.

3 – REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – Bioprospecção

A bioprospecção pode ser definida de várias formas, mas de maneira geral é a busca por microrganismos, enzimas, genes e proteínas com finalidade de aplicação na ciência ou tecnologia gerando um produto de valor agregado. Quando se busca especificamente por algum microrganismo, geralmente trata-se de prospectar aqueles que são cultiváveis em laboratório. Estima-se que menos de 1% de toda biodiversidade microbiana pode ser cultivada em laboratório, e isso limita a compressão da vasta diversidade do planeta. No caso dos microrganismos incultiváveis, pode-se usar a metagenômica, que é uma técnica em que o material genético de determinado ambiente é coletado, isolado, ampliado e comparado com bibliotecas de DNA disponíveis (ALMEIDA *et al.*, 2015).

A busca sistemática por microrganismos, plantas e moléculas orgânicas não é algo recente. A civilização há anos utiliza e testa diversos produtos naturais que potencialmente podem ser aproveitados de alguma forma, e com isso cada vez mais tecnologias e técnicas de bioprospecção de alguma molécula ou agente têm sido desenvolvidas, e com isso ocorre à valorização da biodiversidade como fonte de produtos de valor agregado. Na Figura 1 temos um fluxo de atividades e procedimentos adotados para utilizar a biodiversidade para desenvolver bioprodutos (FILHO *et al.*, 2014).

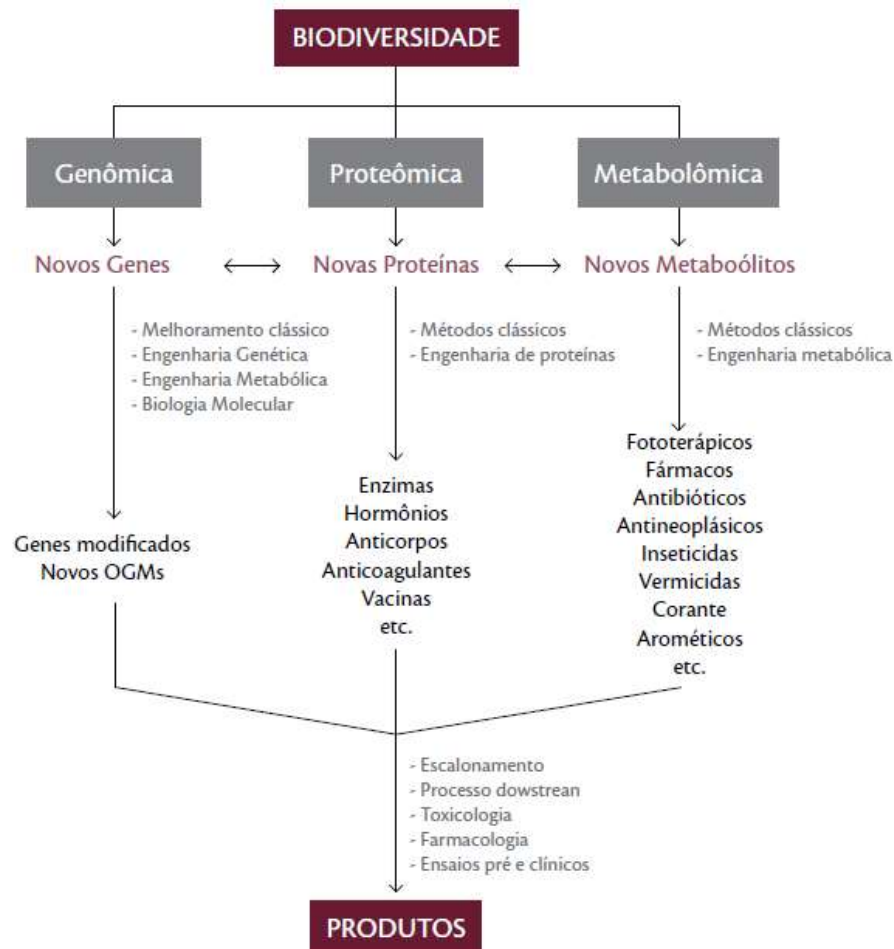


Figura 1: Fluxo de atividades de pesquisa em bioprospecção/biotecnologia envolvendo diferentes setores modernos da biologia molecular que propiciam o desenvolvimento de novos bioprodutos. Fonte: FILHO *et al.*, 2014.

A bioprospecção clássica de microrganismos com características específicas é feita através da busca em ambientes de características adversas e semelhante a alguma condição em estudo ou nos variados habitats sujeitos a diferentes pressões ecológicas. A partir de amostras é feita a triagem e o isolamento do microrganismo que possui as propriedades desejadas. Além do método clássico, uma molécula orgânica pode ser obtida por técnicas de engenharia de proteínas, embora seja um método altamente específico, na maioria dos casos não é usado devido alto valor de operação e equipamentos requeridos (SOARES, 2016).

A exploração da diversidade microbiana é justificada pela notável diversidade metabólica e adaptabilidade genética dos microrganismos, o que torna a

bioprospecção microbiana como importante ferramenta para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável, além é claro do desenvolvimento de produtos de valor agregado nos diferentes ramos industriais (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Atualmente a bioprospecção utiliza tecnologias avançadas com o objetivo de desenvolver novos produtos farmacêuticos, agroquímicos, cosméticos, aromas, fragrâncias, enzimas industriais e outros produtos. Para regularização do processo existem leis específicas para que a entidade ou pesquisador envolvido na bioprospecção tenha a obrigação de compensar o país ou região na qual o material biológico foi coletado, sendo que cada país tem o direito e soberania para controlar o acesso à biodiversidade nas suas fronteiras, sendo que nesse contexto é importante estar atento quanto à biopirataria (ARTUSO, 2002).

3.2 – Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos, tendo como função aumentar a velocidade de uma reação por meio da redução da energia de ativação da mesma, a ação das enzimas pode levar a um aumento da velocidade de reação por um fator de até 10^{20} vezes a mais que a reação não catalisada, sendo que o equilíbrio da reação não é afetado pela enzima. As enzimas apresentam alto grau de especificidade por seus substratos, sendo depois dos antibióticos as moléculas biológicas mais conhecidas. Para que a catálise ocorra é necessário que o substrato se ligue ao sítio ativo da enzima, quando isso ocorre é formada uma estrutura denominada como complexo enzima-substrato que após dois processos catalíticos dimensionais o produto gerado é solubilizado em fase aquosa (NELSON & COX, 2014; TOMBINI, 2015).

O que torna as enzimas moléculas de grande importância como catalisadores é que as mesmas são altamente ativas, versáteis e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido o que é interessante industrialmente. Diferente da catálise química, a especificidade das enzimas permite operar diferentes reações sem a ocorrência de reações paralelas indesejáveis, além de a atividade enzimática ser facilmente regulada dentro de uma faixa de operação. A

catálise enzimática foi descrita pela primeira vez em estudos de digestão de carne no final dos anos de 1700, utilizando secreções de estômago como agente degradante (COLEN, 2006).

Nos processos de biotransformação, ou seja, as modificações específicas ou interconversões da estrutura tridimensional realizadas por catalisadores biológicos, as enzimas são os agentes mais desejados quando existem restrições com a permeabilidade do substrato da membrana da célula, ou quando ocorrem reações secundárias indesejadas. A utilização industrial de enzimas ocorre principalmente nas indústrias de detergente e amido, mas o interesse industrial por tecnologias enzimáticas aumenta cada vez mais, principalmente na área de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais. Os processos com destaque industrial são as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídios pelas lipases (CASTRO *et al.*, 2004).

As reações catalisadas por enzimas podem ter mecanismos diferentes, os principais mecanismos são: efeito de proximidade e orientação, catálise eletrostática, catálise ácido-básica geral e a catálise covalente. O efeito de proximidade e orientação está relacionado ao fato de que para que a enzima possa atuar sobre o substrato deve ocorrer correta aproximação espacial entre o sítio ativo da enzima e o substrato, no posicionamento correto ocorre a formação do complexo enzima-substrato com posterior liberação do produto; a catálise por íons metálicos ocorre quando um íon (geralmente zinco, magnésio ou cálcio) estão ligados a aminoácidos do centro ativo da enzima e atuam durante a catálise orientando o substrato ou estabilizando eletricamente o complexo enzima-substrato; catálise ácido-básica geral necessita da transferência de prótons de um substrato ou de um intermediário, e com isso os grupos químicos se tornam mais reativos; já na catálise covalente ocorre a formação de uma ligação covalente transitória entre a enzima e o substrato e assim aumenta-se a velocidade da reação (MOTTA, 2006).

As enzimas podem ter origem vegetal, animal e microbiana. No caso das enzimas de origem vegetal, essas podem influenciar o processamento dos alimentos de várias formas, como no amolecimento e escurecimento de frutas, o que gera grandes perdas de alimentos por ano. Dentre as enzimas de origem vegetal as de maior interesse são as proteases como, por exemplo, a papaína e a bromelina.

Como exemplo de enzimas de origem animal pode-se citar a pancreática, a tripsina, a pepsina e a renina. Já as enzimas microbianas produzidas comercialmente são provenientes de bactérias e fungos sendo que a maioria é extracelular e da classe hidrolase (FERNANDES, 2009; GONÇALVES, 2006).

Quanto a sua estrutura, as enzimas possuem estrutura molecular complexa, sendo formada principalmente por uma parte proteica que pode estar integrada a outras moléculas como carboidratos e lipídeos. A estrutura primária das enzimas é formada pela sequência linear de aminoácidos ligados entre si; a estrutura secundária é formada pelas interações da cadeia linear com os aminoácidos adjacentes, formando arranjos espaciais do tipo α -hélice ou folha β ; já a estrutura terciária corresponde a torções e dobramentos tridimensionais causados pelas interações entre aminoácidos não adjacentes sequencialmente; em alguns casos a enzima pode interagir com outras cadeias polipeptídicas formando assim a estrutura quaternária (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Todas as enzimas, com exceção de moléculas de RNA catalítico, são proteínas. Por isso, a atividade catalítica é totalmente dependente da sua estrutura. Quando uma enzima é desnaturada ou dissociada nas suas subunidades a enzima torna-se inativa. Algumas enzimas necessitam de outras moléculas ou grupos químicos como os cofatores e coenzimas para exercer a sua função catalítica, o cofator pode ser um ou mais íons inorgânico e as coenzimas são moléculas orgânicas ou metalorgânicas complexas que têm como função o carregamento transitório de grupos funcionais. A maioria das coenzimas é derivada das vitaminas e nutrientes orgânicos provenientes da alimentação. Em alguns casos as enzimas podem ser modificadas covalentemente por fosforilação, glicosilação e outros processos que podem estar envolvidas na regulação da atividade enzimática (NELSON & COX, 2014).

As enzimas são classificadas pelas reações que catalisam. A *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) classifica as enzimas em seis classes com base no tipo de reação catalisada como podemos ver na Tabela 1. Neste sistema o número de classificação é formado por 4 números conhecidos como E.C. Neste sistema de classificação temos que o 1º dígito refere-se à classe da enzima, 2º a subclasse, 3º a grupos químicos específicos que participam da reação

e o 4º dígito se refere ao nome sistemático da enzima (FERNANDES, 2009; GONÇALVES, 2006; NELSON & COX, 2014).

Tabela 1: Classificação internacional das enzimas.

Núm. classe	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons
2	Transferases	Reações de transferências de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liasas	Clivagem de C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares

Fonte: NELSON & COX, 2014.

As enzimas podem sofrer inibição, ou seja, alguma substância é capaz de interferir de maneira específica na taxa de velocidade de uma reação catalítica. Existem dois tipos de inibição, a reversível e irreversível. A inibição reversível como diz o próprio nome não é um processo permanente, sendo dividido em três tipos básicos: competitivo, não competitivo e incompetitivo. O inibidor competitivo apresenta características estruturais e de afinidade parecidas com as do substrato e por isso compete com o mesmo pelo sítio ativo da enzima, podendo levar a formação de um complexo enzimático inativo. Um inibidor não competitivo liga-se a um sítio diferente do sítio de ligação do substrato, apresentando o comportamento de remoção da enzima ativa da solução resultando na redução da velocidade da

reação devido à quantidade de enzima livre. O inibidor incompetitivo se liga somente ao complexo enzima-substrato formado, a ligação ocorre em um sítio de ligação diferente do sítio em que o substrato se encontra ligado à enzima. Já a inibição irreversível, o inibidor se liga ao sítio ativo da enzima de maneira irreversível, em muitos casos por ligações covalentes podendo até destruir grupos funcionais essenciais, sendo um processo progressivo ao longo do tempo até atingir o máximo de inibição (MARQUES & YAMANAKA, 2008).

3.3 – Lipase

As lipases (glicerol éster hidrolase, E.C.3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol formando diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres. Estas enzimas são amplamente distribuídas nos diferentes seres vivos, apresentando peso molecular variando de 20-75 kDa com cerca de 300 resíduos de aminoácidos, sendo glicoproteínas em que a parte glicosilada hidrofóbica circunda o sítio ativo, apresentando capacidade catalítica na interface água e óleo (CARVALHO *et al.* 2003).

O estudo mais antigo em que a atividade catalítica das lipases foi observada é datado de 1856 em que Claude Bernard descobriu no suco pancreático a existência de uma enzima que hidrolisava gotículas de óleo insolúveis e as convertia em produtos solúveis. As enzimas que hidrolisam triglicerídeos são estudadas há mais de 300 anos, e a capacidade das lipases de catalisar a hidrólise e síntese de ésteres é reconhecida há quase 90 anos (HASAN *et al.*, 2006).

Estas enzimas pertencem ao grupo das α/β -hidrolases e possuem um padrão de dobramento específico, sendo compostas por um núcleo de oito folhas β , principalmente paralelas, rodeadas por α -hélices. As lipases possuem uma estrutura semelhante a uma “tampa” que tem forma de pequena α -hélice ou de laço que possui a função de bloqueio do sítio ativo, esta tampa na presença do substrato lipídico sofre mudanças conformacionais expondo o sítio ativo e uma grande área hidrofóbica facilitando a ligação da enzima na interface água e óleo (CORTEZ *et al.*, 2017).

A diferença entre uma lipase e uma esterase (E.C.3.1.1.1) é que as lipase catalisam reações de substratos insolúveis em água, e a segunda em substratos solúveis. As esterases hidrolisam éster com ácidos carboxílicos de cadeia curta enquanto as lipases acilglicerídeos de cadeia longa (RICO, 2009; VECCHIA *et al.*, 2004).

Pelo fato que as lipases atuam na interface água e óleo, estas enzimas contrariam as equações de Michaelis-Menten para cinética enzimática, isto ocorre devido a essas equações serem válidas somente em fases homogêneas. Para a determinação da velocidade de reação é necessário determinar a área superficial de uma emulsão de partículas por unidade de volume e não a concentração de lipídeos na emulsão (GOMES *et al.*, 2006).

Ao contrário das lipases as esterases seguem a cinética de Michaelis-Menten aumentando sua atividade conforme a aumenta a concentração de substrato até um limite de saturação, enquanto as lipases não apresentam atividade quando seus substratos estão presentes em estado monomérico, porém ocorre aumento da atividade enzimática, como pode ser visto na Figura 2, quando a concentração de substrato está próxima ou maior que o limite de solubilidade, o que explica o fato que a lipase não hidrolisa substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima denominada concentração micelar crítica, é acima desta concentração que ocorre a ativação interfacial da enzima (PADILHA, 2010).

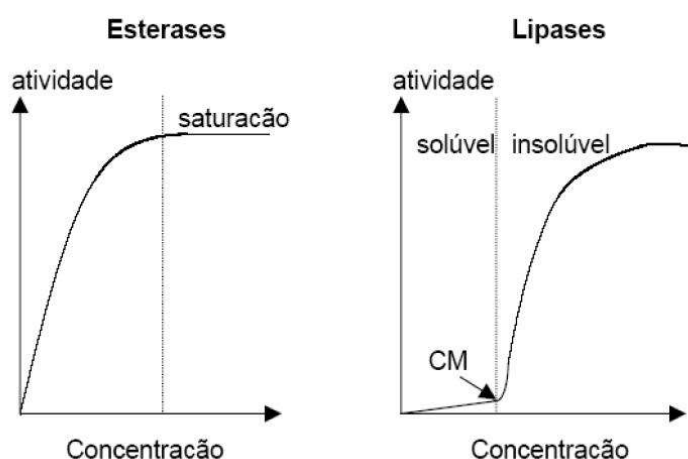


Figura 2: Comportamento catalítico das lipases e esterases, onde CM é a concentração micelar. Fonte: PADILHA, 2010.

Embora seja um mecanismo comum, não são todas as lipases que possuem a tampa que controla o acesso do substrato da enzima ao sítio ativo, por isso que a ativação interfacial não é um critério adequado para a classificação da enzima. A melhor definição de lipase é a de carboxilesterases que catalisam a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa (CORTEZ *et al.*, 2017). De acordo com CARVALHO *et al.*, (2003) e DELGADO (2014) as lipases microbianas são classificadas em três grupos em função de sua especificidade com o substrato:

- Lipases 1,3 específicas: são as que catalisam a liberação de ácido graxo especificamente das posições C1 e C3 dos acilgliceróis produzindo ácidos graxos, 2-monoacilglicerol e 1,2 ou 2,3-diacilglicerol que são quimicamente instáveis ocorrendo a migração do grupo acil para produzir 1,3-diacilglicerol e 1 ou 3-monoacilglicerol, as lipases produzidas pelos microrganismos *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger* e *Mucor miehei* são exemplos de lipases desse grupo;
- Lipases não específicas são aquelas que catalisam a hidrólise de triacilglicerol em ácidos graxos livres e glicerol de modo aleatório, tendo como intermediários mono e diacilglicerol. Como exemplos temos as lipases de *Candida cylindracea*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus* sp. e *Pseudomonas fluorescens*;
- Lipases ácido graxo específicas são aquelas que catalisam a hidrólise de tipos específicos grupos acilas nas moléculas de triacilglicerol como exemplo podemos citar a lipase produzida pelo *Geotrichum candidum* hidrolisa preferencialmente grupos acilas de cadeia longa com dupla ligação *cis* na posição 9.

As lipases são enzimas que evoluíram para atuar com propriedades biofísicas no microambiente interfacial onde seus substratos são encontrados. Existem diferentes graus de seletividade da enzima, embora as lipases sejam capazes de catalisar diferentes substratos, a taxa de reação varia de acordo com a estrutura molecular do substrato em questão (REIS *et al.*, 2009).

Como vários compostos de alta e baixa massa molecular podem ser substratos para a lipase como, por exemplo, tioéster, amidas, poliidroxiéster e hidroxiácidos, entre outros compostos, além da hidrolase esta enzima é capaz de catalisar várias outras reações como podemos ver na Figura 3 (PARQUES & MACEDO, 2006).

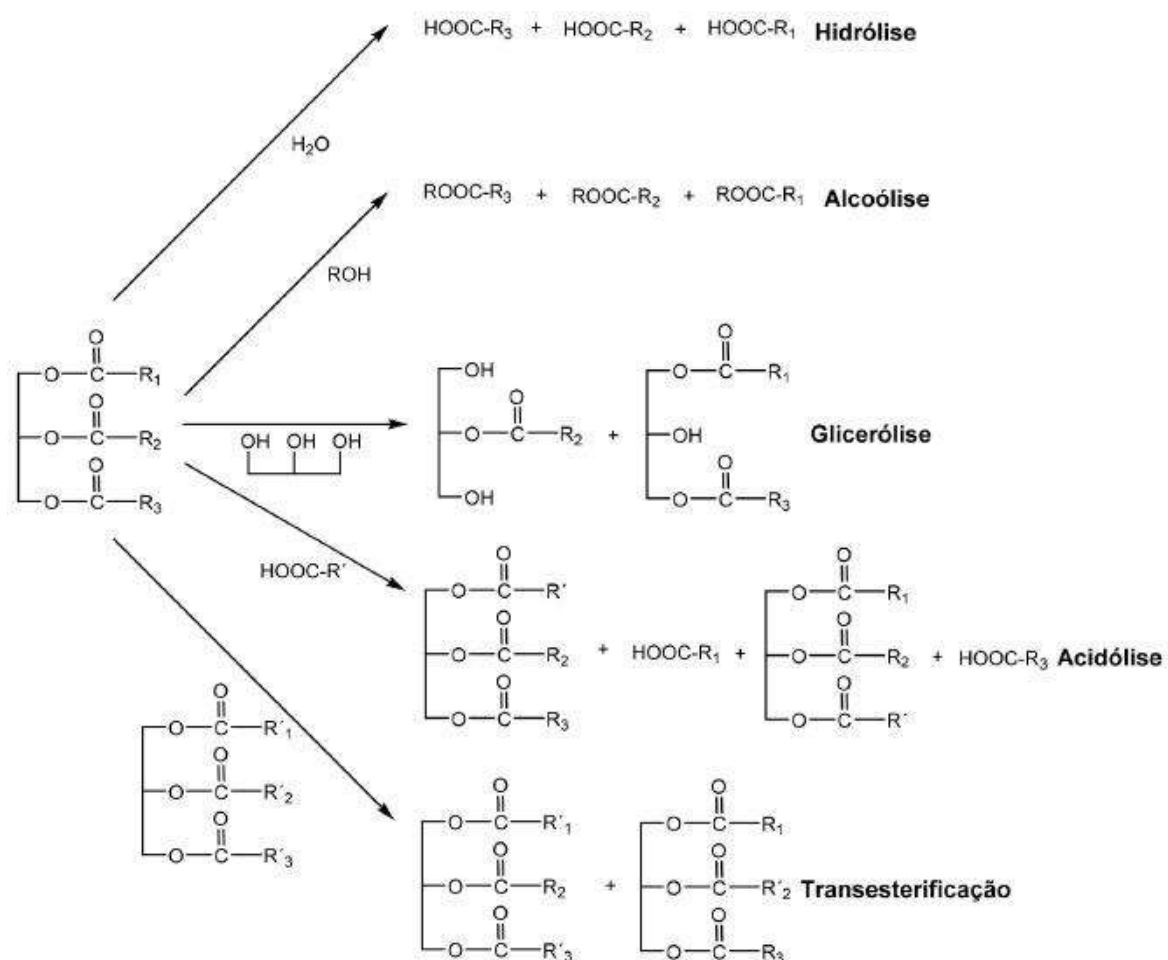


Figura 3: Exemplos de algumas reações catalisadas pelas lipases. Hidrólise é a reação que ocorre na presença da interface água/óleo. Alcoólise é a reação de transferência de um grupo acila entre um acilglicerol e um álcool. Glicerólise é a reação de interesterificação de um triacilglicerol com um glicerol. Acidólise é a transferência de um grupo acil entre um acilglicerol e um ácido carboxílico. Transesterificação é a troca de um grupo acil entre gliceróis. Fonte: CORTEZ *et al.*, 2017.

A hidrólise é a reação enzimática que ocorre na interface lipídeo/água, assim quanto maior esta interface maior a quantidade de enzima adsorvida o que acarreta taxas de hidrólise mais elevada. Esta reação consiste no rompimento da ligação

éster do glicerídeo produzindo glicerol e ácidos graxos. O tipo e a posição estereoespecífica do resíduo de ácido graxos estão relacionados com a elevada especificidade das lipases, permitindo desta forma uma ampla aplicação da enzima (DELGADO, 2014; MACEDO & PARQUES, 2006).

As reações básicas de hidrólise e formação de ésteres (denominada esterificação) catalisados pelas lipases podem ser combinadas resultando nas reações de interesterificação que são um rearranjo na molécula de glicerol possibilitando modificações das propriedades pela ação de um catalisador, neste caso a lipase. A reação de alcoólise ocorre quando o grupamento acila é transferido entre um acilglicerol e um álcool. Já a acidólise acontece quando a transferência do grupamento acila ocorre entre um acilglicerol e um ácido carboxílico. A reação de glicólise ocorre quando acontece a interesterificação de um triacilglicerol com um glicerol. Quando a troca de grupos acila é entre dois gliceróis temos a reação de transesterificação (CORTEZ *et al.*, 2017; DELGADO, 2014; MACEDO & PARQUES, 2006).

As propriedades das lipases variam conforme a sua procedência. Embora a enzima possa ser encontrada tanto em animais como em vegetais, as lipases microbianas apresentam algumas vantagens em relação às demais como a maior produtividade e facilidade de purificação pelo fato de muitas vezes as lipases microbianas serem enzimas extracelulares, além de serem enzimas termoestáveis apresentando versatilidade e simplicidade na manipulação para aumentar o rendimento de produção (PADILHA, 2010).

Dependendo da origem, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, como ponto isoelétrico entre 4 e 10, pH de atuação na faixa de 4 a 9 e temperatura de atuação de 25 a 70°C, o que contribui para a ampla aplicação da enzima nos diferentes processos. Uma propriedade da lipase que tem chamado a atenção dos pesquisadores é a sua estabilidade na presença de solventes orgânicos, pelo fato de que isso poderia ser usado em possíveis reações em que não pode haver a presença de água (PADILHA, 2010).

Como toda enzima a atividade da lipase pode sofrer alterações, porém devido a grande quantidade de tipos de lipases existentes não existe uma metodologia universal para a dosagem da atividade lipolítica. O método mais simples é a titulação

com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima no substrato. Outro método muito utilizado é o de espectrofotometria que se baseia na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100 e o produto da reação (*p*-nitrofenol) é quantificada por espectrofotometria a 410 nm. O índice enzimático é um método simples e também muito utilizado, e se baseia na relação matemática entre o diâmetro da colônia e do halo de degradação do microrganismo em meio sólido (PADILHA, 2010).

3.4 – Lipases microbianas

Dentre as várias enzimas que são produzidas industrialmente as de origem microbiana são as que apresentam maior interesse comercial. As mais utilizadas são produzidas por fungos pelo fato de serem extracelulares, o que facilita o processo de recuperação e purificação, além de apresentarem maiores taxas de produção (COLLA *et al.*, 2012).

Os fungos filamentosos são os que têm melhores resultados para a produção de lipases sendo que os gêneros que mais se destacam são os *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium* (COLLA *et al.*, 2012). A maioria das leveduras produtoras de lipases comercialmente importantes é pertencente à classe dos ascomicetos como, por exemplo, a *Candida* sp. As leveduras lipolíticas são encontradas em variados habitats. Para a utilização industrial as lipases de fontes bacterianas são consideradas as mais resistentes e que atendem as características exigidas para cada tipo de aplicação. Na Tabela 2 temos alguns microrganismos produtores e fornecedores de lipases industriais (GUPTA *et al.*, 2015; JAVED *et al.*, 2017).

Tabela 2: Microrganismos produtores e fornecedores de lipases comerciais

Produtor	Fornecedor
<i>Aspergillus niger</i>	Aldrich, Amano, Biocatalysts, Fluka, Novozymes, Röhm
<i>Aspergillus</i> sp.	Novozymes
<i>Candida antarctica A</i>	Boehringer, Fluka, Novozymes
<i>Candida antarctica B</i>	Fluka, Novozymes, Boehringer
<i>Candida cylindracea</i>	Meito
<i>Candida rugosa</i>	Aldrich, Altus, Amano, Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Meito Sangyo, Sigma, Roche
<i>Mucor miehei</i>	Amano, Boehringer, Biocatalysts, Fluka, Novozymes
<i>Penicillium roqueforti</i>	Amano, Biocatalysts, Fluka
<i>Pseudomonas</i> sp.	Amano, Boehringer, Fluka, Mitsubishi, Röhm, Sigma
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Sigma
<i>Rhizopus oryzae</i>	Amano, Sigma

Fonte: Adaptado de KUHN, 2010.

As lipases microbianas são produzidas na maioria das vezes por fermentação submersa, embora a fermentação em estado sólido seja em alguns casos uma alternativa viável e barata. A produção de lipase também pode ocorrer utilizando células imobilizadas a fim de reter a atividade catalítica por um período maior de tempo. A produção pode ser influenciada pelo tipo de microrganismos e lipase, pelas concentrações das fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido (COLLA *et al.*, 2012).

Nos microrganismos as lipases apresentam atividade fosfolipídica, sendo utilizada como mecanismo de defesa e competição ecológica. Quando são secretadas no meio, facilitam a digestão dos lipídeos para a ingestão de nutrientes, e os ácidos graxos livres liberados auxiliam na adesão tecidual entre células/célula e célula/hospedeiro. As lipases podem também atuar em sinergismos com outras

enzimas em variadas situações fisiológicas de acordo com as necessidades em que o microrganismo produtor se encontra (STEHR *et al.*, 2003).

Como já citado anteriormente, as características químicas e cinéticas das lipases variam com o microrganismo produtor, com o gênero, espécie e cepa; dentre os vários tipos de lipases algumas apresentam características importantes e de interesse industrial como, por exemplo, a estabilidade térmica e pH de atuação. As lipases produzidas por bactérias termofílicas chamam atenção pela sua estabilidade em altas temperaturas e as lipases psicofílicas por serem estáveis em baixas temperaturas o que permite sua aplicação na síntese de intermediários orgânicos quirais termossensíveis; quanto ao pH de atuação pode se encontrar lipases produzidas por bactérias que atuam em pH alcalino ou lipases que atuam em faixa maior de pH variando entre 2 e 10 como por exemplo a lipase produzida por *Staphylococcus epidermidis* (MESSIAS *et al.*, 2013).

Para a exploração comercial de lipase microbiana é necessária que a mesma apresente alto rendimento, alta atividade e estabilidade. Alto rendimento e alta atividade garantem que a lipase tenha grande competição no mercado, já a alta estabilidade permite que a mesma tenha amplo campo de aplicação, tempo de meia-vida e ciclo de uso maior. A enzima quando produzida por fermentação submersa sofre influência do tipo e concentração de fonte lipídica indutora; e dos fatores nutricionais e físico-químicos do meio que influenciam diretamente o rendimento da enzima. Na fermentação em estado sólido um dos fatores mais críticos é a umidade do meio visto que afeta diretamente a produção da enzima. Várias tecnologias estão sendo desenvolvidas a fim de aumentar o rendimento e estabilidade das lipases microbianas, porém não existe nenhuma metodologia universal que pode ser aplicada para todos os produtores da enzima (SHU *et al.*, 2010).

3.5 – Produção industrial

A demanda industrial de novas fontes de lipases com diferentes características catalíticas tem estimulado o isolamento e seleção de novas estirpes de microrganismos produtores, que podem ser biosprospectados em diferentes

ambientes. Industrialmente as lipases são enzimas importantes devido a seu potencial de produção em grande escala, além é claro, da ampla aplicação desta enzima (BHARATHI *et al.*, 2018).

A fim de se obter maior produtividade na produção, novos substratos são testados para produção de lipases em escala industrial. Diferentes tipos de resíduos industriais e os seus complexos teores orgânicos são uma importante fonte de nutrientes residuais que podem servir de meio para o crescimento microbiano e produção de enzima. Substratos provenientes da agroindústria têm sido testados para a produção de lipases por fermentação em estado sólido com bons resultados, embora a natureza do substrato sólido (umidade e tamanho de partícula) e os parâmetros físicos (temperatura, pH e condutividade térmica) influenciam diretamente na produção da enzima. Na Tabela 3 temos alguns resíduos renováveis que podem ser utilizados por microrganismos para a produção de lipases (NEETHU *et al.*, 2015).

Os resíduos agroindustriais são produzidos em grandes quantidades em países em desenvolvimentos e com grande atividade agrícola como no Brasil, embora esses materiais tenham grande potencial de exploração, a maioria ainda é usada na alimentação animal ou destinada para aterros sanitários. Efluentes industriais produzidos a partir de refinarias de petróleo, de matadouros e de indústria de produtos lácteos que contêm altas concentrações de lipídeos (maiores que 100 mg/L) também se apresentam como potenciais substratos para a produção de lipases (NEETHU *et al.*, 2015; SALIHU *et al.*, 2012).

Tabela 3: Alguns resíduos da agroindústria utilizados por vários microrganismos para a produção de lipase

Microrganismo	Substrato	Atividade enzimática máxima (U/g)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de soja e casca de arroz	25,22
	Farelo de trigo	630
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Torta de óleo gergelim	363,6
	Resíduo de rícino	155,8
	Torta de babaçu	20
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Torta de babaçu	98,78
<i>Penicillium verrucosum</i>	Farelo de soja	40
<i>Penicillium restrictum</i>	Rejeito de óleo de babaçu	30,3
<i>Penicillium citrinum</i>	Resíduo de óleo vegetal	6,738
<i>Penicillium sp.</i>	Farelo de soja	317
	Refeição de soja	186
<i>Rhizopus oryzae</i>	Farelo de trigo	96,52
<i>Rhizopus chinensis</i>	Farelo de trigo	24,447
<i>Rhizopus homothallus</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	10,7
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Torta de azeitona e bagaço de cana-de-açúcar	20,24
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	Casca de arroz	4
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Noz triturada e farelo de cevada	23
	Torta de semente de níger	26,42
<i>Candida cylindracea</i>	Lixo de moinho de oliva	20,4
	Efluente de moinho de óleo de palma	20,26
<i>Candida rugosa</i>	Soro de leite	15
<i>Bacillus sp.</i>	Torta de óleo de nozes	4,5
<i>Bacillus coagulans</i>	Rejeito de meão	78,069
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Torta de jojoba	1084

Fonte: Adaptado de SALIHU *et al.*, 2012.

A produção de lipase depende em grande parte dos microrganismos, práticas de cultivo, composição média e design de biorreator. A escolha do tipo de fermentação a ser adotado irá depender de vários fatores como, por exemplo, o custo de operação e a produção. A fermentação submersa é a técnica mais utilizada para a produção de enzimas microbianas, apresentando algumas vantagens em relação à fermentação em estado sólido tais como melhor transferência de massa e calor, maior produtividade e facilidade de purificação de enzimas extracelulares (BHARATHI *et al.*, 2018; SALIHU *et al.*, 2012).

Como a maioria das enzimas de interesse industrial, as lipases são produzidas na presença de indutores que podem ser triacilgliceróis, surfactantes, óleos vegetais, resíduos da indústria de petróleo ou seus produtos de hidrólise que quando presentes no meio podem ter efeito indutivo para a produção da enzima. Vários estudos têm testado fontes lipídicas como indutores na produção de lipases por fermentação submersa ou em estado sólido, pode-se citar como exemplos: Tween® 80, azeite de oliva, óleo vegetais e resíduos lipídicos sólidos como torta de babaçu, coque e farelo de soja (DAMASO *et al.*, 2008).

Embora a presença de um indutor seja necessária para a produção de lipase, em alguns microrganismos foi detectada a atividade lipolítica em nível basal (não induzido). As enzimas basais e as induzidas são bioquimicamente idênticas feitas pela transcrição de genes estruturais idênticos. O padrão microbiano da produção de lipase ocorre da seguinte forma: no estado inicial a lipase ligada à célula (nível basal) é capaz de hidrolisar o indutor presente no substrato a uma taxa de reação alta o suficiente para iniciar o crescimento celular e a indução enzimática. À medida que a fermentação ocorre e a concentração de substrato diminui, a produção de lipase extracelular torna-se necessária para que ocorra a digestão de substrato e a nutrição da célula. Desta forma a atividade enzimática extracelular máxima coincide com a fase de crescimento estacionário tardio (SALIHU *et al.*, 2012).

3.6 – Fermentação submersa

Existem dois processos básicos que podem ser utilizados para a produção de enzimas, sendo eles a fermentação submersa e a em estado sólido, a Tabela 4 reúne algumas vantagens e desvantagens de cada uma delas.

Tabela 4: Comparações entre a fermentação submersa e em estado sólido

Vantagens		Desvantagens	
Fermentação submersa	Fermentação em estado sólido	Fermentação submersa	Fermentação em estado sólido
Melhor transferência de calor e massa	Baixo consumo de água e resistência a contaminação	Operação mais complexa	Transferência de calor e massa não homogênea
Melhor distribuição de microrganismos no meio	Substrato mais barato	Alto custo de energia e implantação	Em maiores escalas é difícil controlar parâmetros de operação
Comercialmente disponível em grande escala	Redução nos efluentes gerados	Elevada produção de efluentes	Difícil aumento de escala

Fonte: Adaptado de DORIYA *et al.*, 2016.

A fermentação submersa é bastante utilizada pelo fato de apresentar facilidade para o crescimento de microrganismos em condições controladas de operação, e por permitir a recuperação da molécula alvo com maior facilidade e menor custo, e por esses motivos foi a técnica adotada neste trabalho (ORLANDELLI *et al.*, 2012). Na Figura 4 temos um esquema simplificado da produção de enzimas microbianas em escala industrial utilizado a fermentação submersa.

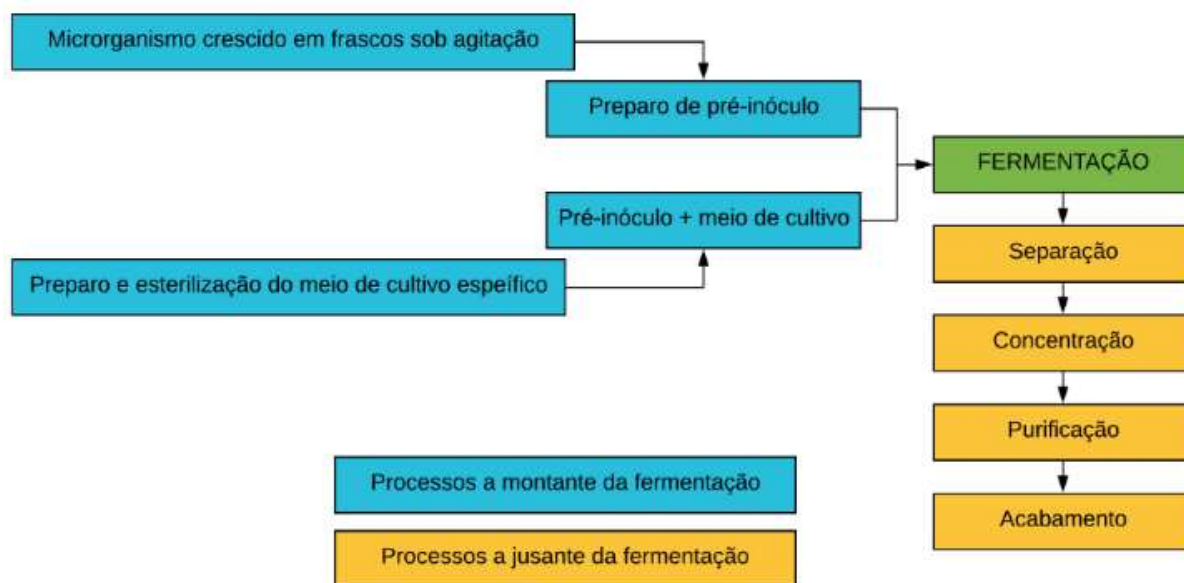


Figura 4: Fluxograma simplificado da produção de enzimas microbianas utilizando o processo de fermentação submersa. Fonte: Adaptado de ORLANDELLI *et al.*, 2012.

Na fermentação submersa o meio de crescimento se encontra líquido e os nutrientes requeridos solubilizados no meio junto com os microrganismos em suspensão. A produção de enzimas por fermentação submersa pode ocorrer em frascos agitados como erlenmeyers, em fermentadores de bancada ou fermentadores em escala industrial. Os fermentadores podem operar de três formas diferentes: contínua, em que existe constante entrada de substrato e saída do meio fermentado; semi-contínua ou batelada alimentada que é o processo em que ocorre alimentação de substrato no fermentador durante a fermentação, mas o meio fermentado com o produto de interesse permanece até o final da fermentação; e podem também operar em batelada em que uma única entrada de substrato é fornecida durante o processo (PINHEIRO, 2006).

Como podemos ver na Figura 4 o processo de fermentação em si é precedido por etapas que são denominados processos a montante da fermentação ou processos *upstream* e após a fermentação processos a jusante ou processos *downstream* (SANT'ANNA, 2001). Os processos *upstream* têm como função a preparação do substrato e do inóculo para o processo de fermentação, podendo iniciar na bioprospecção do microrganismo ou a partir de uma cultura pura que irá ser cultivada em menores volumes em frascos sob agitação até atingir a fase de

crescimento exponencial média ou tardia, e então transferida para fermentadores de volume intermediário de 100 a 500 litros até atingir a taxa de crescimento necessária e após isso transferido para os fermentadores industriais (KILIKIAN & PESSOA, 2005).

Já os processos *downstream* ou a jusante são todos aqueles relacionados ao processo de recuperação e purificação da enzima ou célula (quando esta é o produto desejado), nesta etapa é necessário garantir que a molécula alvo não sofra desnaturação pelo processo adotado. A metodologia adotada nesta etapa irá depender da localização da molécula alvo e do grau de pureza requerida. Quando o microrganismo eleito foi um fungo filamentoso a separação de extrato enzimático bruto pode ser feita por filtração simples ou centrifugação; mas caso os microrganismos produtores sejam uma levedura ou bactéria deve-se utilizar técnicas de filtração mais elaboradas, centrifugação ou cromatografia (KILIKIAN & PESSOA, 2005; ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Além dos parâmetros básicos de operação da fermentação como pH, temperatura e aeração; o meio de cultivo utilizado tem influência direta no sucesso e produtividade do processo fermentativo. O meio de cultivo deve fornecer todas as condições nutricionais necessárias para o crescimento do microrganismo além de ser barato e não dificultar o processo de recuperação do produto. A composição do meio pode ser conhecida como no caso dos meios comerciais ou complexa quando se adota meios alternativos como os efluentes de agroindústria (SALIHU *et al.*, 2012).

Durante todo o processo de fermentação é necessário garantir que não ocorram contaminações por agentes externos, que podem gerar perdas e prejuízos. Desde o cultivo da cultura pura em bancada ou isolamento do microrganismo de interesse deve se adotar boas práticas de operação para evitar ou conter qualquer possível contaminação. Por isso é necessário que os operadores sejam bem treinados e que os equipamentos atendem as boas práticas de fabricação permitindo fácil limpeza e desinfecção (SANT'ANNA, 2001).

3.7 – Aplicações tecnológicas

Como podemos ver na Figura 3 (tópico 3.3 – Lipase) as lipases são capazes de catalisar outros tipos de reações além da hidrólise, e esta versatilidade em associação com facilidade de produção da enzima em escala industrial permite que a lipase possa ser aplicada em vários tipos de indústria como na de alimentos, detergentes, farmacêutica, de couro, têxtil e cosmética, entre outras (CORTEZ *et al.*, 2017). Na Figura 6 há algumas das aplicações industriais das lipases.

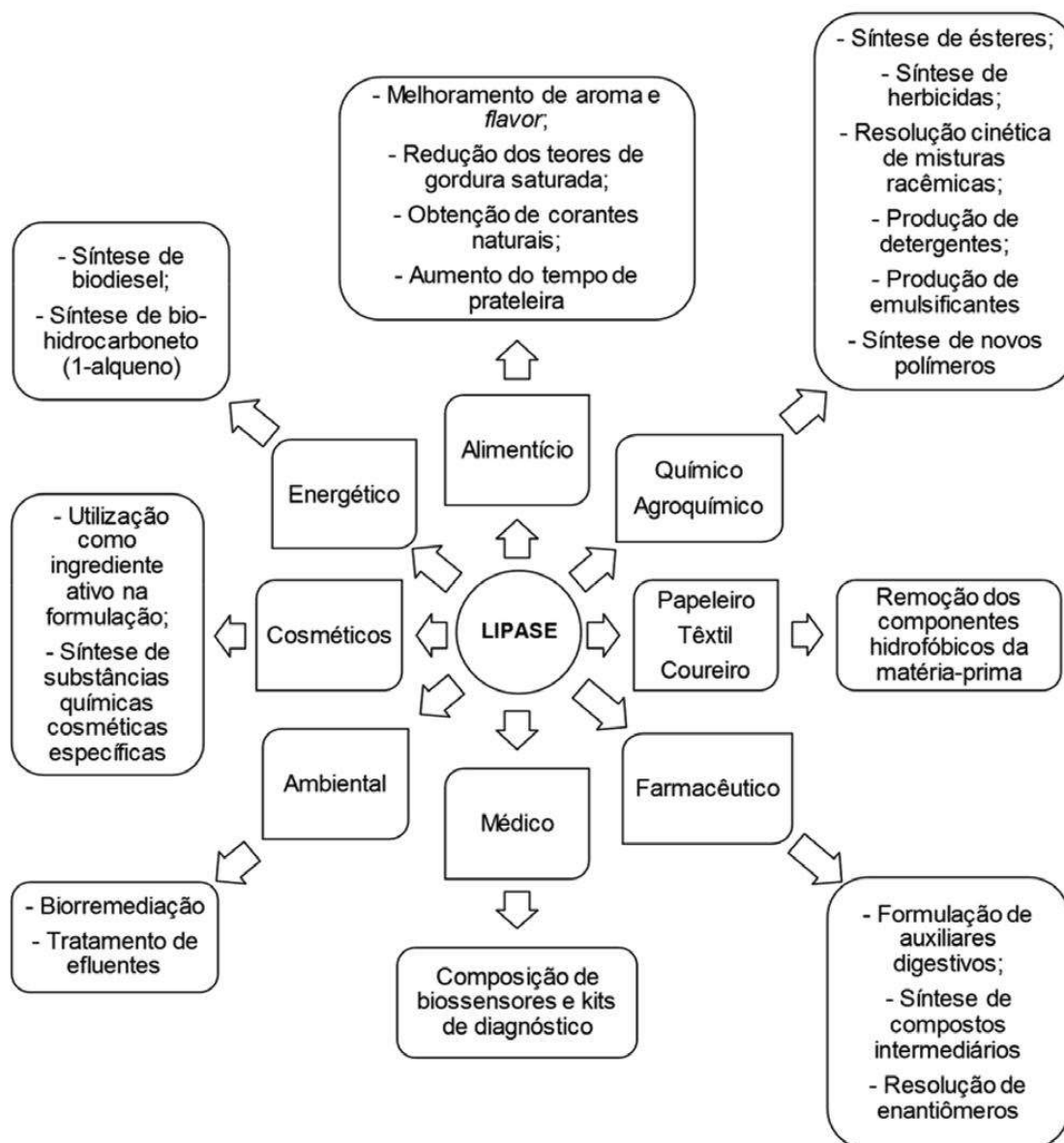


Figura 5: Algumas das aplicações industriais das lipases. Fonte: CORTEZ *et al.*, 2017.

As lipases são uma das classes de enzimas mais aplicadas na biotecnologia e na indústria, e parte disto se deve a “promiscuidade catalítica” que a enzima apresenta. Promiscuidade enzimática é um termo relativamente novo na enzimologia e se refere à capacidade das enzimas de catalisar reações alternativas que diferem da sua reação fisiológica natural, porém essas reações geralmente são menos eficientes (KAPOOR & GUPTA, 2012).

Lipases microbianas são as mais utilizadas no comércio e na pesquisa devido suas propriedades, pela facilidade de produção em massa em comparação às lipases de outras origens, e também pela sua estabilidade que é superior. Os processos catalisados por lipases apresentam relação de custo e eficácia maior em comparação aos processos tradicionais de catálise química (HASAN *et al.*, 2006).

Outro fator que é determinante para ampla aplicação das lipases em ambiente industrial é a sua estabilidade em ambientes diversos. As cepas microbianas isoladas de ambientes de condições ambientais extremas produzem lipases com características únicas para suportar diferentes condições de operações como os ambientes de caráter ácido e básico, alta concentração de sais e presenças de solventes orgânicos (SALIHU & ALAM, 2015).

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Bioprospecção do microrganismo

Para a bioprospecção da lipase foi feito o cultivo de 7 amostras diferentes com o objetivo de encontrar algum microrganismo produtor da enzima alvo. As amostras testadas foram: espuma de caixa de gordura do restaurante universitário do Campus Alto Paraopeba da Universidade Federal de São João Del-Rei, solo contaminado com óleo lubrificante (20° 28' 3,367" S e 43° 50' 58,405" W), amostras de solo de raiz de bambu (20° 28' 1,967" S e 43° 50' 57,852" W, 20° 28' 1,703" S e 43° 50' 57,911" W), abacate em decomposição, manteiga mofada e banha de galinha deteriorada.

As amostras foram inoculadas em meio YMA (*Yeast Malt Agar*) que tem como composição: 1% glicose; 0,5% peptona; 0,3% extrato de levedura; 2% ágar bacteriológico e 0,3% de extrato de carne. As placas foram identificadas e incubadas a 30°C durante 96 horas no escuro.

Após o período de incubação, as colônias que apresentavam características morfológicas (macroscópicas) diferentes foram replicadas e isoladas pelo método de esgotamento por estrias até se obter a cultura pura.

As culturas isoladas foram armazenadas a 4°C em tubos de ensaios contendo o meio YMA e repicados a cada 30 dias a fim de manter a cultura viável para posteriores testes caso necessário.

4.2 – Seleção quanto atividade lipolítica

Para a seleção de microrganismos com atividade lipolítica foi utilizado um meio seletivo denominado meio A. A composição deste meio é: 1% peptona; 0,5% NaCl; 0,1% $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$; 2% ágar bacteriológico e 1% Tween® 80.

As culturas puras foram inoculadas em placas contendo o meio A e incubadas a 30°C por 96 horas no escuro. Para a verificação do halo de degradação da lipase extracelular foi usado o método sugerido por JETTE *et al.* (1994) que consiste na adição de 0,2% (v/v) de solução alcoólica, 1% de rodamina B, como indicador de atividade lipolítica.

Os microrganismos que cresceram no meio seletivo foram armazenados a 4°C em tubos de ensaios contendo o meio YMA.

4.3 – Determinação da atividade enzimática em meio sólido

A determinação da atividade lipásica extracelular foi feita pela determinação do índice de atividade enzimática (*IE*) dado pela Equação 1 conforme RODRIGUES *et al.* (2016) *apud* HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975). Por esse método é analisado a correlação direta entre o diâmetro do halo de degradação e o halo de crescimento do microrganismo. Para a verificação do halo de degradação após o tempo de incubação, as placas foram observadas sob luz ultravioleta (350 nm).

Os halos foram medidos por meio de uma régua e valores obtidos aplicados na Equação 1.

$$IE = \left(\frac{\phi_{CH}}{\phi_C} - 1 \right) \times 10 \quad \text{Equação 2}$$

Onde: *IE* índice enzimático;

ϕ_{CH} diâmetro da colônia + mais halo;

ϕ_C diâmetro da colônia.

4.4 – Determinação do microrganismo com maior atividade lipásica

O pré-inóculo para a fermentação submersa foi preparado com os microrganismos que apresentaram *IE* maior ou igual a 2. Tais microrganismos foram inoculados em Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio denominado como meio B e tinha como composição 1% peptona; 0,5% NaCl; 0,1% $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$; 1% Tween® 80. O pré-inóculo foi incubado a 30°C em agitador rotativo por 24 horas em rotação de 120 rpm.

A padronização dos inóculos foi realizada pela densidade óptica (D.O.) do pré-inóculo em 600 nm. Era esperado que o crescimento do microrganismo apresentasse D.O. de 0,05.

A fermentação submersa em triplicada foi realizada por 96 horas no mesmo volume de meio, temperatura e rotação do pré-inóculo. Para a obtenção do extrato enzimático, após o período de fermentação, o meio de cultivo foi centrifugado por 25 minutos a $16128 \times g$, o sobrenadante foi recolhido para ser usado na determinação da atividade lipolítica.

A determinação da atividade enzimática seguiu o método proposto por BURKERD *et al.* (2004), que baseia na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima presente no extrato enzimático com NaOH $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$. Em um Erlenmeyer de 250 mL foi adicionado 2mL de tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} pH 7, 5 mL de emulsão de azeite de oliva composto por 3,75 mL de solução de goma arábica 7 (1g de goma para cada 30 mL de água destilada) e 1,25 mL de azeite de oliva, e por fim 1 mL do extrato enzimático; esse conjunto foi incubado por 30 minutos, 37°C e 120 rpm. Para parar a reação foi adicionado 15 mL de solução (v/v) 1:1:1 de água:acetona:etanol, em seguida adicionou-se 3 gotas de fenolftaleína e titulou-se com a solução de NaOH $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$. Nas condições de fermentação, uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima que é requerida para liberar $1 \mu\text{mol}$ de ácido graxo por minuto por mL de meio fermentado (ROVEDA *et al.*, 2010).

Para a caracterização do microrganismo que apresentou maior atividade lipolítica foi realizado microcultivo em meio YMA para posterior observação utilizando microscopia ótica e a coloração diferencial de Gram para a sua classificação como Gram-positivo ou Gram-negativo.

4.5 – Fermentação submersa

O microrganismo que apresentou maior atividade enzimática no item 4.4 foi cultivado por fermentação submersa, utilizando como indutor de produção de lipase o óleo de cozinha usado filtrado, e para controle também realizado foi uma fermentação usando Tween® 80 como indutor. A fermentação ocorreu por 120 horas usando Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio B, sendo que em uma das fermentações o Tween® 80 foi substituído pelo óleo de cozinha usado filtrado. A temperatura de incubação foi de 30°C e a rotação do agitador orbital foi 120 rpm. A

cada 24 horas amostras dos meios foram retidas para a determinação da atividade lipolítica.

4.6 - Sistematização e nomenclatura dos microrganismos

Os microrganismos isolados receberam um nome que permitisse entender com clareza sua origem, sendo que a estrutura de cada nome era dada por: quantidade de repiques necessários para o isolamento seguindo pela letra R; tipo de amostra (A para abacate, M para manteiga, SB para solo bambu, SC para solo contaminado, BG para banha de galinha e CG para caixa de gordura) e numeração para diferentes microrganismos de mesma origem.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Cultivo e isolamentos de microrganismo

Após o período de incubação das amostras em meio YMA variados microrganismos cresceram em placa como podemos ver na Figura 6.

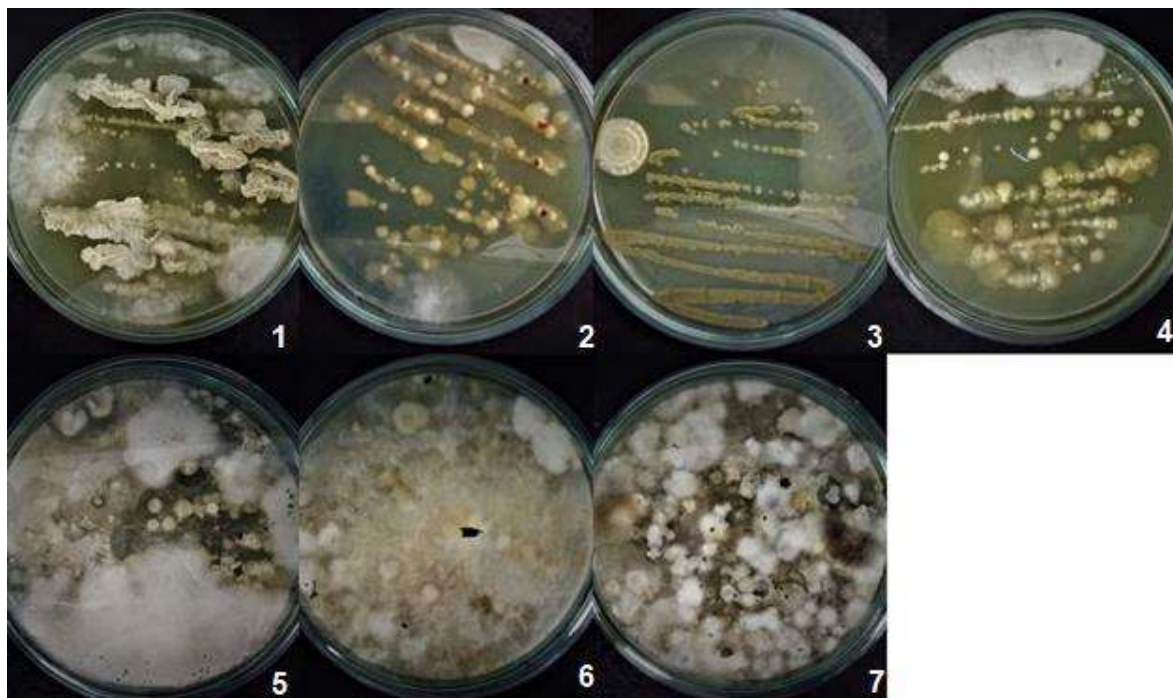


Figura 6: Microrganismos que cresceram no meio YMA após 96 horas de incubação das amostras. Placa 1 inoculada com abacate em deposição. Placa 2 inoculada com banha de galinha deteriorada. Placa 3 inoculada com manteiga mofada. Placa 4 inoculada com espuma da caixa de gordura. Placa 5 inoculada com solo de raiz de bambu (20° 28' 1,967" S e 43° 50' 57,852" W). Placa 6 inoculada com solo contaminado com óleo lubrificante (20° 28' 3,367" S e 43° 50' 58,405" W). Placa 7 inoculada com solo de raiz de bambu (20° 28' 1,703" S e 43° 50' 57,911" W). Fonte: Autor.

Foram isolados 13 tipos de microrganismos com características morfológicas macroscópicas diferentes de acordo com a textura, relevo, bordas e coloração, usando o método de esgotamento por estrias.

5.2 – Seleção de microrganismos produtores de lipase

De acordo com SANDOVAL & MARTY (2007) a atividade lipásica pode ser monitorada pela liberação dos ácidos graxos ou glicerol proveniente da ação da enzima. O uso de meio de cultivo sólido com substrato indutor como o Tween® 80, que foi utilizado no experimento, acrescentado de 0,2% (v/v) de solução alcoólica 1% de rodamina B permite a observação do halo de degradação da lipase ao redor da colônia quando exposto à luz ultravioleta (350 nm). Conforme metodologia descrita por JETTE *et al.*, (1994), esse método é específico para lipases, e não havendo a formação de halo fluorescente para atividade de esterases (COLEN, 2006).

Após o período de incubação 9 microrganismos (Figura 7) apresentaram resultado positivo para a produção de lipase. Esses microrganismos foram denominados como: 1RSCI, 1RSCII, 1RSCIII, 1RSBI, 1RSBII, 1RSBIII, 1RA, 1RCG e 2RSC.

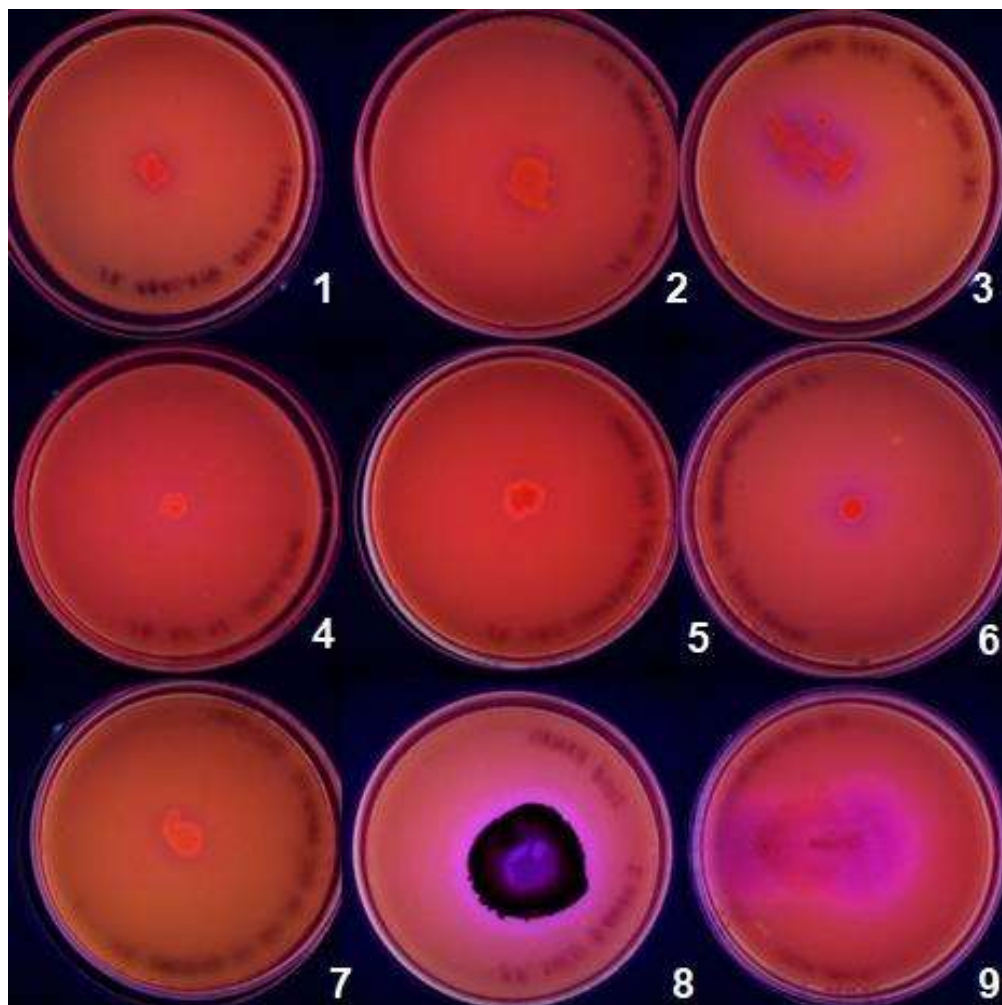


Figura 7: Microrganismos que apresentaram resultado positivo para produção de lipase em meio sólido observados em luz ultravioleta (350 nm). Em 1 o microrganismo 1RA, 2 o microrganismo 1RSCIII, 3 o microrganismo 1RSBI, 4 o microrganismo 1RSCG, 5 o microrganismo 1RSCI, 6 o microrganismo 1RSCII, 7 o microrganismo 1RSBIII, 8 o microrganismo 1RSBII e 9 o microrganismo 2RSC. Fonte: Autor.

Além do halo de degradação que se apresenta como uma zona clara ou turva (opaca) em torno das colônias produtoras de lipases extracelular como podemos ver do microrganismo 2RSBII na Figura 8, pode ocorrer também a formação de cristais de cálcio do ácido láurico provenientes da degradação completa dos sais de lipídeos (RODRIGUES *et al.*, 2016). Porém não foi observada a formação de cristais ao redor de nenhuma das colônias após o período de incubação.

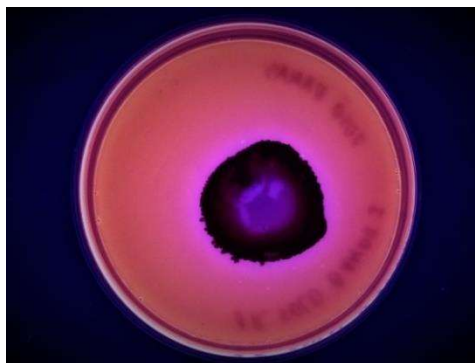


Figura 8: Halo de degradação de lipase extracelular do microrganismo 2RSBII quando observado em luz ultravioleta (350 nm) em meio de cultivo com rodamina B. Fonte: Autor.

O microrganismo 2RSC quando exposto à luz ultravioleta não apresentou formação de halo de degradação ao redor da colônia microbiana, e sim a mudança de coloração em cima toda a sua superfície como se pode observar na Figura 9.



Figura 9: Mudança de coloração de toda superfície do microrganismo 2RSC quando observado em luz ultravioleta (350 nm) em meio de cultivo com rodamina B. Fonte: Autor.

Em seu trabalho de isolamento e seleção de fungos produtores de lipase provenientes de variados fontes RODRIGUES *et al.*, (2016) obteve resultado semelhante em 51 de 100 fungos analisados, afirmando que essa mudança de coloração sobre toda a colônia se deve a atividade lipolítica intracelular.

Em cinco dos nove microrganismos: 1RA, 1RCG, 1RSBII, 1RSBIII e 1RSCI; como podemos ver na Figura 10 para o microrganismo 1RSBIII, não houve formação perceptível (macroscopicamente) de halo ao redor ou fluorescência sobre a colônia microbiana, estas colônias apresentaram crescimento lento e reduzido comparado com as demais, e este evento pode ter ocorrido pelo fato de que os microrganismos

não estavam utilizando a fonte de carbono do meio, que no caso era Tween® 80, mas sim que seu crescimento ocorreu devido ao seu metabolismo endógeno.

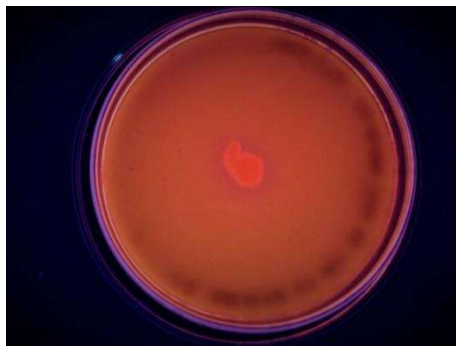


Figura 10: Ausência de halo de degradação do redor da colônia e fluorescência da colônia do microrganismo 1RSBIII quando observado em luz ultravioleta (350 nm) em meio de cultivo com rodamina B. Fonte: Autor.

DEWES & RIBBONS (1964) definem metabolismo endógeno como o conjunto de reações metabólicas totais que ocorrem em uma célula na ausência de compostos ou elementos que podem servir de substratos exógenos específicos, os microrganismos podem também assimilar nutrientes em um ambiente mais nutritivo e com menor pressão ecológica, e posteriormente utilizar esse material como substrato endógeno em condições mais severas.

A ausência de halo de degradação ou fluorescência sobre a colônia microbiana que são resultados específicos de atividade lipolítica na presença do corante adotado (rodamina B), ou a não formação de cristais de cálcio do ácido láurico no meio, não são indicativos de que o microrganismo está produzindo esterase ao invés de lipase, isso ocorre, pois de acordo com SPERB *et al.* (2015) as esterases hidrolisam facilmente ácidos graxos de cadeia curta como o Tween® 20, porém raramente hidrolisam o Tween® 80 que é hidrolisado principalmente por lipases uma vez que contêm ésteres de ácidos oleicos.

A relação entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro da cultura microbiana conforme a Equação 1 fornece o índice enzimático apresentado na Figura 11.

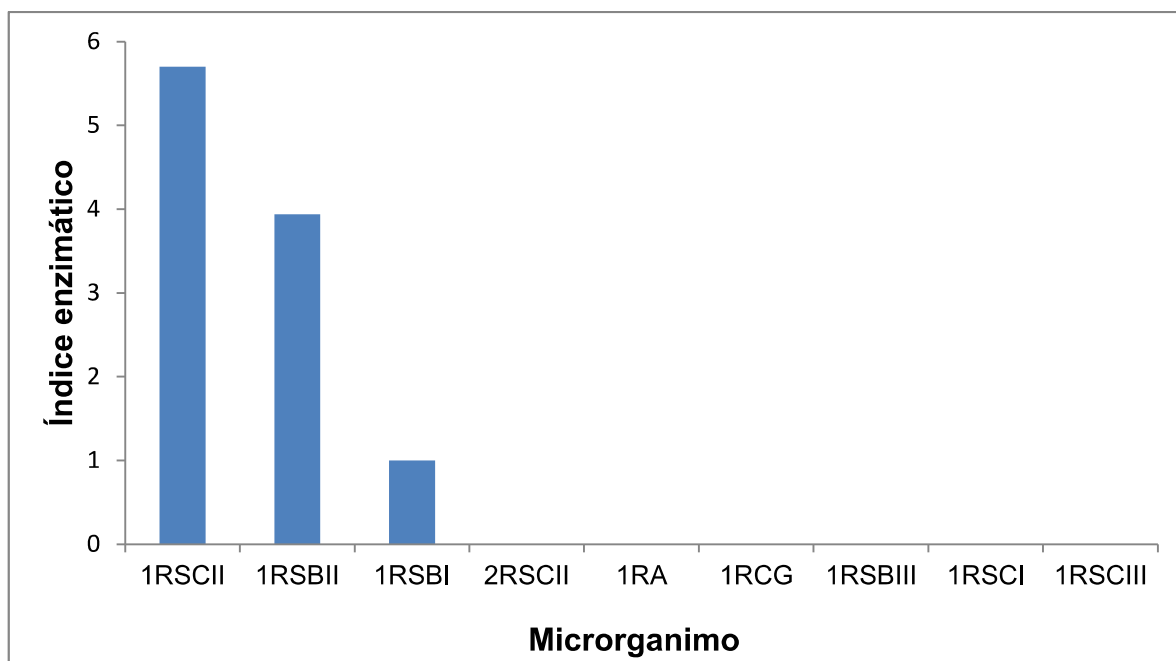


Figura 11: Índice enzimático dos microrganismos que apresentaram resultado positivo no teste no meio seletivo quanto atividade lipolítica. Fonte: Autor.

De acordo com LEALEM & GASHE (1994) quando se avalia microrganismos produtores de enzimas em meio sólido, os que apresentam índice enzimático ≥ 2 são os que apresentam melhor potencial de produção de enzimas extracelulares em meio sólido, desta forma, os microrganismos 1RSCII e 1RSBII são os mais promissores com índices enzimáticos de respectivamente 5,7 e 3,94. Já o 1RSBI não apresenta índice enzimático satisfatório por ser menor que 2, sendo que o valor apresentado foi 1. Os demais microrganismos que apresentaram índice enzimático zero são produtores de lipase intracelular ou apresentam metabolismo endógeno.

O teste de índice enzimático não foi realizado em repetições devido à carência do corante rodamina B.

5.3 – Atividade lipolítica

Os microrganismos que apresentaram índice enzimático maior ou igual a 2 (1RSBII e 2RSCII) foram cultivados em fermentação submersa e a atividade enzimática monitorada após o fim do processo. Pode-se ver na Figura 12 a atividade enzimática após 96 horas de fermentação. Foi definido como unidade enzimática (U)

a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácido graxo por minuto por mL de meio de cultivo fermentado.

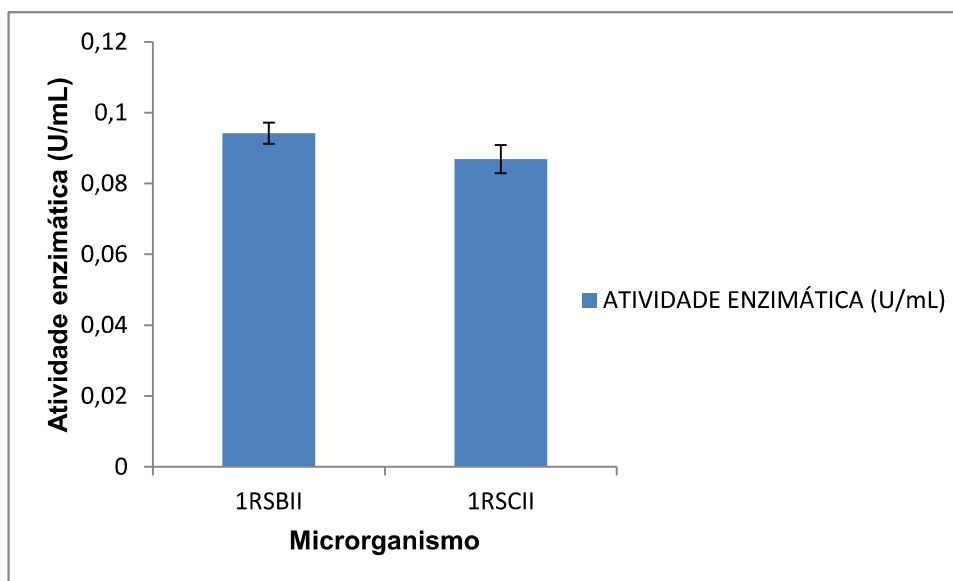


Figura 12: Atividade enzimática dos dois microrganismos (1RSBII, 1RSCII) com maior índice enzimático após 96 horas de fermentação submersa. Fonte: Autor.

A atividade enzimática dos dois microrganismos após o período de fermentação comparado com a literatura foi baixa. ROVEDA *et al.*, (2010) utilizando como meio de cultivo efluente coletado na saída do equalizador do sistema de tratamento de efluente de laticínio obteve como atividade enzimática máxima o valor de 2,250 U, o que sugere que os 9 microrganismos isolados não são bons produtores de lipase e ou que as condições de operação e meio de cultivo adotados nos experimentos não são os mais propícios para a produção da enzima.

De acordo com COLLA *et al.* (2012) a produção de lipases microbianas pode ser influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, pH do meio, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido. A fonte lipídica de carbono indutora da produção da enzima tem papel essencial no alto rendimento de produção e atividade enzimática, os indutores mais utilizados são azeites de oliva e palma, Tween® 20, 40 e 80, trioleína e tripalmitina e óleos vegetais. A fonte de nitrogênio que pode ser orgânica ou inorgânica, o pH e aeração (no caso de fermentação submersa) ideal irá depender do tipo de microrganismo, sendo um

processo muito difícil seguir parâmetros generalistas de condições de crescimento como os que foram adotados nos experimentos, podendo também justificar a baixa atividade enzimática encontrada.

O microrganismo que apresentou maior atividade lipolítica após 96 horas de fermentação submersa com Tween® 80 como indutor foi o 1RSBII com atividade enzimática de $0,09 \pm 0,003$ U/mL. Foi realizada a uma segunda fermentação com o mesmo por 120 horas usando também um novo indutor, no caso óleo de cozinha usado e filtrado. Na Figura 13 encontra-se o resultado da atividade enzimática ao longo do período de 120 horas de fermentação.

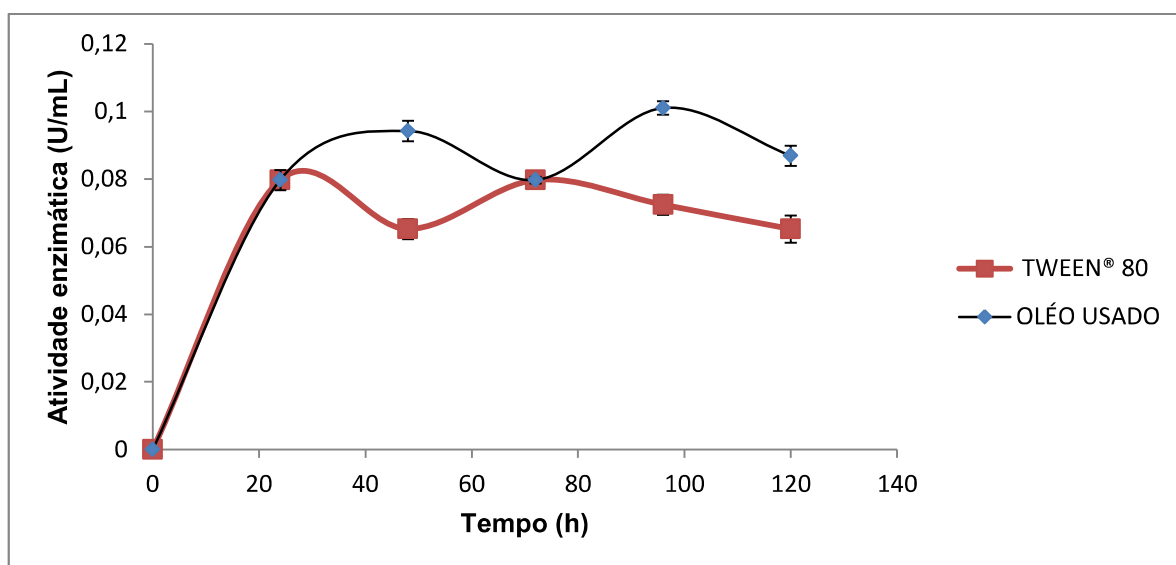


Figura 13: Atividade enzimática ao longo das 120 horas de fermentação submersa utilizando como indutor óleo de cozinha usado e Tween® 80 para o microrganismo 1RSBII. Fonte: Autor.

A atividade enzimática máxima utilizando o óleo usado como indutor ocorreu após 96 horas de cultivo com $0,1 \pm 0,002$ U/mL de atividade enzimática, enquanto na fermentação com Tween® 80 a atividade enzimática máxima foi de $0,08 \pm 0,002$ U/mL observado o mesmo valor após 24 e 72 horas de cultivo.

Quanto a caracterização do microrganismo 1RSBII que apresentou maior atividade enzimática na fermentação por 96 horas com Tween® 80 como indutor temos na Figura 14 o resultado da microscopia ótica. Demonstrando que se trata de uma bactéria na forma de bacilo Gram-negativo.

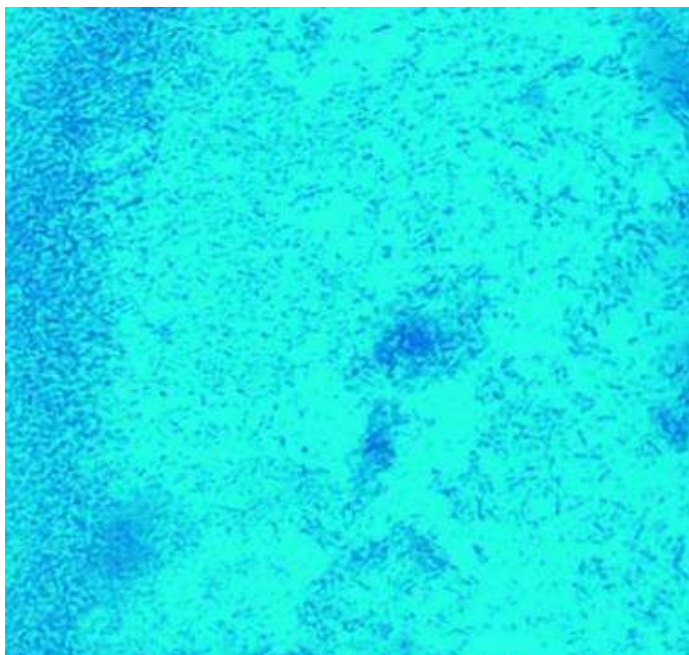


Figura 14: Resultado da microscopia óptica em aumento de 400X do microrganismo denominado como 1RSBII, que se trata de um bacilo Gram-negativo. Fonte: Autor.

A maioria das lipases microbianas disponíveis no mercado são produzidas por fungos filamentosos, devido sua boa produtividade e pelo fato da enzima ser na maioria dos casos extracelular, porém lipases produzidas por bactérias também apresentam características de interesse comercial devido ao fato de apresentar elevada estabilidade em processos industriais que ocorrem em condições mais exigentes (GUPTA *et al.*, 2015; JAVED *et al.*, 2017).

Em estudos futuros com o microrganismo isolado neste trabalho, pode-se otimizar as condições de cultivo. De acordo com BARROS *et al.* (1995) o planejamento e otimização de experimentos permitem dentre outras coisas, determinar a influência de uma ou mais variáveis no produto final. Deste modo encontrar as condições ótimas de operação e produção. A caracterização da lipase produzida também fornece informações muito importantes para explorar as possíveis particularidades da enzima para dada condição e aplicação.

6 – CONCLUSÃO

O método clássico de bioprospecção adotado no experimento se mostrou eficiente na busca por produtores de lipase microbiana. Dos 13 microrganismos isolados 9 apresentaram resultado positivo em meio seletivo. O teste qualitativo de índice enzimático e quantitativo de atividade lipolítica permitiram selecionar um microrganismo para a fermentação com o substrato alternativo, sendo que o microrganismo que apresentou maior índice enzimático não foi o que teve melhor atividade lipolítica do extrato enzimático bruto. O óleo de cozinha usado apresentou atividade enzimática máxima superiores ao meio fermentativo composto somente por meio comercial, o que demonstra um possível potencial para aplicação em maiores escalas, mas antes é preciso realizar mais ensaios e testes para encontrar as condições ideais de fermentação.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.R.M.; COLLARES, D.G.; BARBOSA, P.F.D. Bioprospecção microbiana. **Emprapa**, 2015.

ARTUSO, A. Bioprospecting, benefit sharing, and biotechnological capacity building. **World Development**, vol. 30, nº. 8, p. 1355–1368, 2002.

ALMEIDA, J.R.M.; COLLARES, D.G.; BARBOSA, P.F.D. Bioprospecção microbiana. **Emprapa**, 2015.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1995.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G.; KOMATHI, S. Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. **Journal of King Saud University-Science**, 2018.

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

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.A.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Quim. Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CASTRO, H.F; MENDES, A. A.; SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Quim. Nova**, vol. 27, nº 1, p. 146-156, 2004.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipase**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte MG.

CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 85-96, 2017.

DAMASO, M.C.T.; PASSIANOTO, M.A.; FREITAS, S.C.; FREIRE, D.M.G.; LAGO, R.C.A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 676-681, 2008.

DAWES, E. A.; RIBBONS, D. W. Some aspects of the endogenous metabolism of bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 28, n. 2, p. 126, 1964.

DORIYA, K. JOSÉ, N.; GOWDA, M.; KUMAR, D.S. Solid-state fermentation vs submerged fermentation for the production of L-asparaginase. In: **Advances in food and nutrition research**. Academic Press, 2016. p. 115-135.

EFFERTH, T.; BANERJEE, M.; PAUL, N.W.; ABDELFAH, S.; AREND, J.; ELHASSAN, G.; HAMDOUN, S.; HAMM, R.; HONG, C.; KADIOGLU, O.; NAß, J.; OCHWANGI, D.; OOK, E.; OZENVER, N.; SAEED, M.E.M.; SCHNEIDER, M.; SEO, E.J.; WU, C.F.; YAN, G.; ZEINO, M.; ZHAO, Q.; DARWISH, M.S.A.; ANDERSCH, K.; ALEXIE, G.; BESSARAB, D.; GUHA, D.B.; BOLZANI, V.; DEPAT, E.; DONONKO, F.V.; EFFERTH, M.; GRETEN, H.J.; GUNATILAKA, L.; HUSSEIN, A.A.; KARADENIZ, A.; KHALID, H.E.; KUET, V.; LEE, I.S.; LIU, L.; MIDIWO, J.; MORA, R.; NAKAGAWA, H.; NGASSPA, O.; NOYSANG, C.; OMOSA, L.; ROLAND, F. H.; SHAHAT, A.A.; SAAB, A.; SAEED, E.M.; SHAN, L.; TITINCHI, S.J.J. Biopiracy of natural products and good bioprospecting practice. **Phytomedicine**, n. 23, p. 166-173, 2016.

EVANS, M.; DAVIES, J.K.; SUNDVIST, G.; FIGDOR, D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **International Endodontic Journal**, v. 35, n. 3, p. 221-228, 2002.

FERNANDES, A.P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. p. 58. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.

FILHO, S.A.; SILVA, C.G.N.; BIGI, M.F.M.A. Bioprospecção e biotecnologia. **Parc. Estrat.**, Brasília DF, v.19, n.39, p.45-80, jan-jun 2014.

GOMES, F.; DE PAULA, A.V.; SILVA, G.D.S.; CASTRO, H.F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 710-718, 2006.

GONÇALVES, F. A.G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte MG.

GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in lipid research**, v. 57, p. 40-54, 2015.

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

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I; SIDDIQUE, M.H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in biophysics and molecular biology**, 2017.

KAPOOR, M.; GUPTA, M.N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.

KILIKIAN, B.V.; PESSOA Jr, A. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo: Manole, 2005.

KUHN, G.O. **Comportamento da atividade de esterificação de lipases não comerciais em propano pressurizado**. 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – URI Campus de Erechim, Erechim RS.

LAI, O.-M.; LEE, Y.-Y.; PHUAH, E.T.-T.; AKOH, C.C. **Lipase/Esterase: Properties and Industrial Applications**. [s.l.] Elsevier, 2018

LEALEM, F.; GASHE, B.A. Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). **Journal of Applied Microbiology**, v.77, n.3, p. 348-352, set. 1994.

MARQUES, P.R.B.O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1799-2008.

MHETRAS, N.C.; BASTAWADE, K.B.; GOKHALE, D.V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource technology**, v. 100, n. 3, p. 1486-1490, 2009.

MOTTA, V.T. Bioquímica básica. **Autolab Análise Clínicas**, cap 3, v.9, p. 227, 2006.

NEETHU, C.S. RAHIMAN, K.M.M.; ROSMINE, E.; SARAMMA, A.V.; HATHA, A.A.M. Utilization of agro-industrial wastes for the production of lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Arctic and optimization of physical parameters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 703-709, 2015.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios da Bioquímica de Lehninger**. 6º ed., São Paulo, Artmed, 2014.

OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L.D.; GARBOGGINI, F.F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. **MultiCiência**, n. 7, 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Valeria_Oliveira4/publication/265925918_Preservacao_e_Prospeccao_de_Recursos_Microbianos/links/54c274bf0cf256ed5a8db649.pdf >. Acesso: 04 de janeiro de 2017.

ORLANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, p.97-109, set.-dez., 2012.

PADILHA, G.S. **Caracterização, purificação e encapsulamento de lipase de *Burkholderia cepacia***. 2010. 142 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de Campinas, Campinas SP.

PEREIRA, J.A. **Introdução à cinética enzimática: Cinética da catálise pela invertase**. Universidade do Porto, 2015. (Apostila).

PINHEIRO, T.L.F. **Produção de lipase por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosa* como microrganismo**. 2006. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – URI Campus de Erechim, Erechim RS.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: a review. **Advances in colloid and interface science**, v. 147, p. 237-250, 2009.

RICO, E. **Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja**. 2009. 188 f. Tese (Doutorado em Engenharia de alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis SC.

SALIHU, A.; ABDULKARIM, M.I.; SALLEH, H.M. Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44, 2012.

SALIHU, A.; ALAM, M.Z. Solvent tolerant lipases: a review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 86-96, 2015.

SANDOVAL, Georgina; MARTY, Alain. Screening methods for synthetic activity of lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 390-393, 2007.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 351-362.

SHU, Z.-Y.; JIANG, H.; LIN, R.-F.; JIANG, Y.-M.; LIN, L.; HUANG, J.-Z. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 1-8, 2010.

SPERB, J.G.C.; COSTA, T.M.; VAZ, D.A.; VALLE, J.A.B.; VALLE, R.C.S.; TAVARES, L.B.B.. ANÁLISE QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE LIPASES E BIODISSURFACTANTES POR FUNGOS ISOLADOS DE RESÍDUOS OLEOSOS. **Engevista**, v. 17, n. 3, p. 385-397, 2015.

STEHR, F.; KRETSCHMAR, M.; KROGER, C.; HUBE, B.; SCHAFER, W. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, n. 5-6, p. 347-355, 2003.

TOMBINI, J. **Produção de lipase fúngica a partir de subprodutos do processamento de soja**. 73 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco PR.

TREICHEL, H. DE OLIVEIRA, D. MAZUTTI, M.A.; DI LUCCIO, MARCO; OLIVEIRA, J.V. A review on microbial lipases production. **Food and bioprocess technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

VECCHIA, R.D.; NASCIMENTO, M, G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova**, v. 27, nº 4, p. 623-630, 2004.