

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA  
INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II**

**JAMES JEAN-BAPTISTE**

**AMILASE E LIPASE PRODUZIDAS POR FUNGOS DE  
EFLUENTE TÊXTIL: LEVANTAMENTO CIENTÍFICO E  
TECNOLÓGICO**

**FOZ DO IGUAÇU-PR**

**2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA  
INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**JAMES JEAN-BAPTISTE**

**AMILASE E LIPASE PRODUZIDAS POR FUNGOS DE  
EFLUENTE TÊXTIL: LEVANTAMENTO CIENTÍFICO E  
TECNOLÓGICO**

Projeto de pesquisa apresentado ao curso de bacharelado em biotecnologia, como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Professor orientador: Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

FOZ DO IGUAÇU-PR

2020

## Sumário

<b>RESUMO</b>	5
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	7
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	8
<b>2.1 Natureza e origem das enzimas comerciais</b>	8
<b>2.2 Efluentes da indústria têxtil como reservatório de microrganismos</b>	10
<b>2.3 Diversidade microbiana das amilases</b>	11
<b>2.3.1 Fisiologia da produção de amilase</b>	13
<b>2.3.1.1 Fontes de carbono e nitrogênio</b>	13
<b>2.3.1.2 Temperatura e pH</b>	14
<b>2.3.1.3 Aeração, agitação e íons inorgânicos</b>	16
<b>2.4 Diversidade microbiana das lipases</b>	18
<b>2.4.1 Fisiologia da produção de lipase</b>	19
<b>2.4.1.1 Fontes de carbono e nitrogênio</b>	20
<b>2.4.1.2 Temperatura e pH</b>	21
<b>2.4.1.3 Aeração, agitação e íons inorgânicos</b>	22
<b>2.4.2 Importância biotecnológica das lipases</b>	23
<b>2.5. Patenteamento na Biotecnologia</b>	24
<b>3. Objetivos</b>	25
<b>3.1. Objetivo geral</b>	25
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	26
<b>4. Metodologia</b>	26
<b>5. Resultados e discussão</b>	28
<b>7. Conclusão</b>	34
<b>8. Referências</b>	35

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas envolvidas no desenvolvimento clássico versus o desenvolvimento atual de enzimas.....	9
Figura 2: Esquema da hidrólise do amido por amilase.....	12
Figura 3: Hidrólise de triglicérides por lipase.....	18
Figura 4: Número de registros de patentes por país nos últimos 10 anos com as palavras-chave amylase AND lipase para os 3 escritórios (USPTO, EPO e INPI).....	32
Figura 5: Porcentagem de registros de patentes pedidos por empresas, pessoas e indivíduos nos últimos 10 anos no escritório do USPTO pesquisados com as palavras-chave “Amylase AND Lipase”.....	33
Figura 6: Número de registros de patentes pedidos por país nos últimos 10 anos no escritório do USPTO pesquisados com as palavras-chave “Amylase AND Lipase”.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Amilases utilizadas em vários segmentos industriais e suas aplicações.....	17
Tabela 2: Lipases utilizadas em vários segmentos industriais e suas aplicações.....	24
Tabela 3: Palavras-chave e combinações usadas para pesquisa em banco de dados tecnológicos e científicos.....	27
Tabela 4: Busca de artigos publicados por palavras-chave nas bases de dados de Scopus, NCBI-Pubmed e Web of Science.....	29

## RESUMO

A utilização de enzimas microbianas na indústria biotecnológica é uma ferramenta muito vantajosa em diversos setores industriais uma vez que, as enzimas podem ser obtidas por métodos mais simples, podem ser sintetizadas em grandes quantidades e em uma produção relativamente menos dispendiosa, podendo apresentar estabilidade em várias condições fermentativas. As enzimas de origem fúngica, podem ser consideradas predominantes em relação as enzimas bacterianas, característica que pode favorecer sua utilização em processos fermentativos em batelada bem como métodos extrativos operados em baixo custo. Este trabalho objetivou avaliar quantitativamente as publicações e patentes levantadas envolvendo amilases e lipases produzidas por fungos recuperados da indústria têxtil nos últimos 10 anos. Para isso, foi realizado um levantamento de publicações a partir das plataformas acadêmicas NCBI-Pubmed, *Web of Science* e Scopus, e de patentes, através dos escritórios de patentes do INPI, UPSTO e EPO, por meio do repositório Spacenet. Foram encontradas 238.382 patentes. Desse total, 142 foram originadas no INPI (0,06%), 43.801 (18,37%) no EPO e 194.439 (81,57%) emitidas no USPTO. Entretanto, nenhuma patente foi encontrada utilizando amilase e lipases produzidas por fungos de amostras têxteis. Para os últimos 10 anos, foram encontrados 136 artigos nas bases de dados, sendo que alguns dos artigos estão em mais de uma plataforma. Somente 30 desses artigos apresentam índice de impacto entre 1.0 e 2.5. Nenhum desses artigos mencionaram o uso de efluentes da indústria têxtil como fontes para bioprospecção de fungos produtores de amilases ou lipases. O presente estudo enfatiza a necessidade da busca das enzimas amilase e lipase oriundas de fungos recuperados de efluentes industriais têxteis para futuros estudos biotecnológicos.

**Palavras-chave:** Enzimas microbianas, efluente industrial, patentes, processos industriais.

## **ABSTRACT**

The use of microbial enzymes in the biotechnology industry is a very advantageous tool in several industrial sectors, since the enzymes can be obtained by simpler methods, can be synthesized in large quantities and in a relatively less expensive production, and can present stability in several fermentative conditions. Enzymes of fungal origin can be considered predominant in relation to bacterial enzymes, a characteristic that may favor their use in batch fermentative processes as well as extractive methods operated at low cost. This work aimed to evaluate quantitatively the publications and patents raised involving amylases and lipases produced by fungi recovered from the textile industry in the last 10 years. For this, a survey of publications was carried out from the academic platforms NCBI-Pubmed, *Web of Science* and Scopus, and patents, through the patent offices of INPI, UPSTO and EPO, through the Spacenet repository. Were found 238,382 patents. Of this total, 142 originated at the INPI (0.06%), 43,801 (18.37%) at the EPO and 194,439 (81.57%) issued at the USPTO. However, no patent has been found using amylase and lipases produced by fungi from textile samples. For the last 10 years, 136 articles were found in the databases, some of which are on more than one platform. Only 30 of these articles have an impact index between 1.0 and 2.5. None of these articles mentioned the use of effluents from the textile industry as sources for bioprospecting fungi that produce amylases or lipases. The present study emphasizes the need to search for amylase and lipase enzymes from fungi recovered from industrial textile effluents for future biotechnological studies.

**Keywords:** Microbial enzymes, industrial effluent, patents, industrial processes.

## 1 INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores produzidos por células vivas as quais aceleraram reações bioquímicas específicas e processos metabólicos celulares diversos. São compostos de natureza altamente específica em sua ação sobre substratos e, muitas vezes, atuam em conjunto com outras enzimas para desencadear corretamente as reações nos maquinários metabólicos (Underkofler, Barton e Rennert, 1958).

Desde os tempos remotos, o papel das enzimas é amplamente conhecido. Os primeiros registros estão intimamente ligados à história da Grécia antiga, onde seu uso preponderante voltava-se para o beneficiamento de matérias-primas com fins alimentícios, como a produção de bebidas alcoólicas, queijos, dentre outras. Com o desenvolvimento do conhecimento científico e melhoria de técnicas para purificação de compostos bioativos, especialmente as enzimas termoestáveis, o número de aplicações aumentou muito, com várias novas possibilidades para processos industriais (Haki e Rakshit, 2003).

Em 2019, o mercado global das enzimas industriais foi estimado em US\$ 2,4 bilhões, e deve chegar a 3,2 bilhões em 2025. (Zhang et al., 2020). Partindo de tal dado, destaca-se que o uso de enzimas microbianas na indústria pode ser favorecido, devido a facilidade da manipulação das células produtoras, baixo custo e rapidez no processo de produção, além de estabilidade em várias condições industriais como diferentes pHs, temperaturas e formas de condução do processo fermentativo (Gupta, 2003; Mojsov, 2012).

A demanda industrial por novas fontes de lipases e amilases com diferentes características catalíticas estimula o isolamento e a seleção de novas linhagens microbianas. Efluentes provenientes da indústria têxtil possuem uma grande variedade de microrganismos que podem ser isolados e avaliados quanto ao seu potencial enzimático (Holkar et al., 2016). Estações de tratamento de resíduos industriais têxteis representam habitats promissores no que se refere à recuperação de microrganismos com potenciais capacidades metabólicas únicas. Dentro desta perspectiva, devido às elevadas

temperaturas a que tais processos ocorrem, a bioprospecção de fungos produtores de amilases e lipases é considerada “um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado” (PROLO, 2015), bem como uma alternativa sustentável para a degradação de produtos de alta toxicidade, o que responde à demanda da indústria por enzimas com propriedades catalíticas específicas.

O uso de lipases como catalisadores tem crescido drasticamente nos últimos anos, muito embora, o uso destas enzimas em processos industriais ainda é limitado, devido a sua baixa estabilidade em condições operacionais e baixa atividade (Hasan et al. 2006; Choudhury e Bhunia, 2017). Considerando que amilases com características mais termofílicas, termotolerantes e tolerantes ao pH, podem ajudar a melhorar a gelatinização do amido, diminuir a viscosidade do meio, acelerar reações catalíticas e diminuir os riscos de contaminação bacteriana (Declerck et al. 2003; Paul, 2016), a busca por novas fontes de lipases e amilases com diferentes características catalíticas se faz necessária.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Natureza e origem das enzimas comerciais**

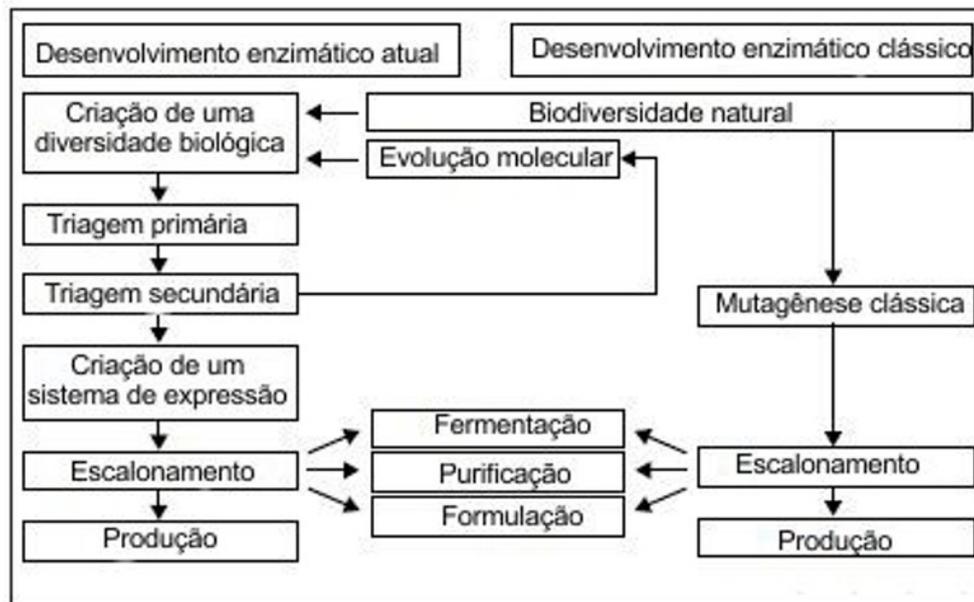
As enzimas podem ser definidas como biocatalisadores produzidos por células vivas, sendo imprescindíveis em diversas reações bioquímicas importantes que ocorrem em microrganismos, plantas, animais e seres humanos (Underkofler, Barton e Rennert, 1958; Mojsov, 2012). Fatores como a diversidade bioquímica, a ampla variedade de atividades catalíticas e os altos rendimentos possíveis na produção enzimática, tornam os microrganismos fontes inestimáveis de uma ampla variedade de enzimas para uso em vários ramos da indústria e da biotecnologia (Choi et al., 2015).

De acordo com as reações que catalisam, a Comissão Internacional de Enzimas classificou seis classes distintas de enzimas: Oxidoreduases EC1; Transferases EC2; Hidrolases EC3; Liases EC4; Isomerases EC5; e ligases EC6 (EC - *Enzyme Commission*, seguido de um dígito que representa a classe enzimática) (Mojsov, 2012). *In natura*, as enzimas produzidas pelos

microrganismos podem ser secretadas em seu interior (intracelular) ou exteriormente (extracelular) e, no caso da produção em escala industrial, as enzimas são preferencialmente secretadas no meio de cultivo, onde podem ser utilizadas em diversos setores indústrias. No que dizem respeito às aplicações industriais, os estudos de purificação enzimática concentraram-se predominantemente em proteases, lipases e amilases (Hussain et al., 2013; Anbu, P. 2013).

A fabricação de enzimas purificadas e bem caracterizadas, mesmo em larga escala, foi possível devido ao desenvolvimento de processos de fermentação durante a parte final do século passado (Tobin, Gustafsson e Huisman, 2000). Além dos processos fermentativos, o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática e a disponibilidade de dados moleculares como sequências inteiras de genomas de células microbianas, aumentaram imensamente as informações necessárias para as tecnologias de síntese e obtenção enzimática. O uso da tecnologia de DNA recombinante, melhorou ainda mais os processos de fabricação e permitiu a comercialização de enzimas que, anteriormente não podiam ser produzidas. (Kirk, Borchert e Fuglsang, 2002). Além disso, os últimos desenvolvimentos da biotecnologia moderna, introduzindo a engenharia de proteínas e a evolução direcionada, revolucionaram ainda mais o desenvolvimento das enzimas de interesse industrial (Suplatov et al., 2015) (Figura 1).

Figura 1: Etapas envolvidas no desenvolvimento clássico versus o desenvolvimento atual de enzimas



Fonte: Kirk, Borchert e Fuglsang, (2002)

A maioria das indústrias utilizam enzimas hidrolíticas para a modificação de vários compostos naturais como a hidrólise de proteínas em aminoácidos, do amido em glicose entre outros. As proteases representam o tipo de enzima dominante, devido ao seu uso extensivo nas indústrias de detergentes e laticínios, respondendo por até 30% do mercado total das enzimas industriais. As amilases, utilizadas nas indústrias têxteis, de panificação, bem como na fabricação de detergentes, representam o segundo maior grupo enzimático, atuando em 25% do mercado (Cherry e Fidantsef, 2003; Rajan, 2004; Abe et al, 2015). Por outro lado, Jaeger et al., (1999) salientam que o uso comercial das lipases, representa um seguimento de bilhões de dólares, englobando diversas aplicações diferentes. Partindo dessa premissa, prevê-se que as lipases, estejam entre as enzimas que mais vem crescendo podendo atingir 590.2 milhões de dólares 2023, com base em suas aplicações em processos incluindo síntese orgânica, produtos farmacêuticos, produção detergentes e de biocombustíveis (Chandra, 2020; Hasan et al., 2006; Snellman e Colwell, 2004).

## 2.2 Efluentes da indústria têxtil como reservatório de microrganismos

Ao longo dos milênios, os microrganismos se adaptaram a ambientes extremamente diversos e desenvolveram uma ampla gama de novas vias

metabólicas ou biblioteca de enzimas catalíticas (Butler e Mason 1997; Kasture, 2017). Essa riqueza metabólica tem sido tradicionalmente explorada pelo homem em processos como fermentação, produção de antibióticos e vitaminas.

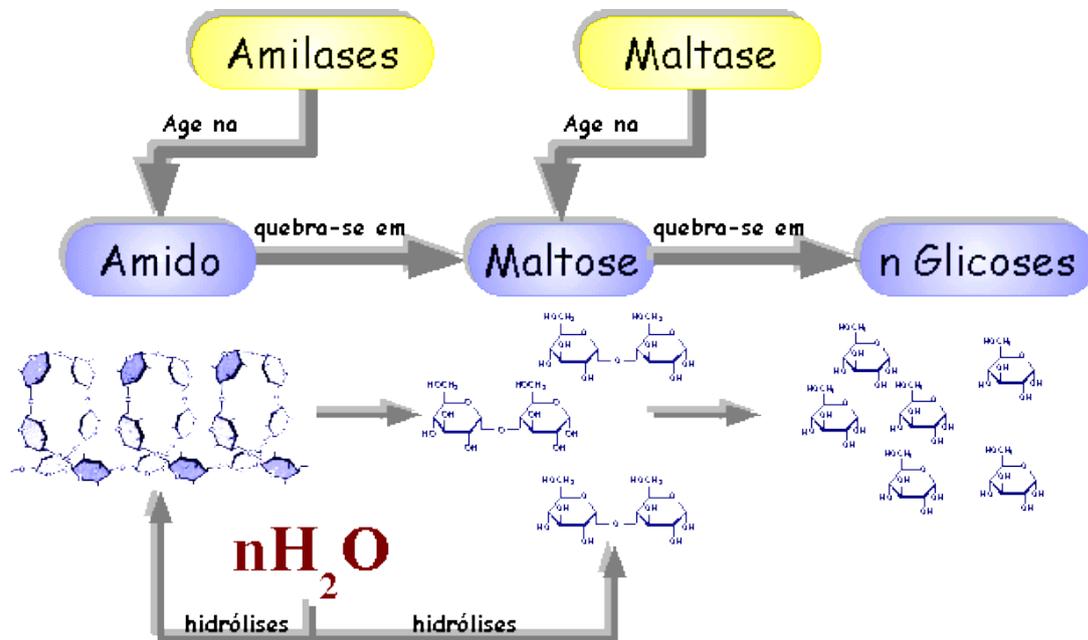
Uma das indústrias potencialmente promissora para a obtenção de células microbianas de interesse biotecnológico é a indústria têxtil, devido ao fato de apresentar nos seus efluentes, uma composição extremamente heterogênea, contendo elevada carga orgânica. Além de forte coloração, os efluentes, também, possuem grande quantidade de sólidos suspensos, pH altamente flutuante, temperaturas altas, considerável quantidade de metais pesados, compostos organoclorados e surfactantes (Khehra et al. 2006; Li et al. 2015; Spagni et al. 2012; Yaseen e Scholz 2016). Em consequência da alta carga xenobiótica de produtos químicos nos efluentes da indústria têxtil, certos microrganismos como fungos e bactérias desenvolveram a capacidade de processá-los. Eles processam os xenobióticos que não fazem parte de seu metabolismo central e os transformam em compostos intermediários, podendo ser utilizados assim por eles. Desta forma, estas moléculas podem ser utilizadas por células microbianas que produzem e secretam uma grande quantidade de enzimas, incluindo amilases e lipases com propriedades específicas, as quais poderão ser utilizadas como biocatalizadores nos diversos processos industriais (Parales et al. 2004).

### **2.3 Diversidade microbiana das amilases**

Por definição, as amilases (EC 3.2.1.1) são, em termos simples, um grupo de enzimas que hidrolisam as moléculas de amido pela adição de uma molécula de água e liberam, assim, vários polímeros menores compostos por unidades de glicose. Entre elas, a  $\alpha$ -amilase e a  $\beta$ -amilase, catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4), e a glucoamilase (amiloglicosidases), as ligações  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) e  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) glicosídicas, atuam no amido e no glicogênio, respectivamente (Guzmán-Maldonado et al., 1995; Taniguchi e Honnda, 2009). As amilases podem ser classificadas como endoamilases ou exoamilases, conforme a localização da reação que ocorre no

interior ou nas extremidades do substrato, respectivamente. As  $\beta$ -amilases e as glucoamilases, atuam na hidrólise das unidades das extremidades não redutoras do substrato, sendo classificadas como exoenzimas. Em contrapartida, as  $\alpha$ -amilases, sendo responsáveis pelo rompimento das ligações no interior do substrato, é uma endoenzima, pois atacam as ligações glicosídicas internas dos  $\alpha$ -glucanos, para produzir pequenas unidades de glicose (monossacarídeo) e maltose (dissacarídeo) (Gupta et al., 2003; Taniguchi e Honnda, 2009) (Figura 2).

Figura 2: Esquema da hidrólise do amido por amilase



Fonte: Gopinath et al., 2017 (adaptado)

De acordo com Erdal e Taskin, (2010), as fontes fúngicas da  $\alpha$ -amilase estão limitadas a isolados terrestres, distribuídos principalmente entre as

espécies de *Aspergillus* e a poucas espécies de *Penicillium*, sendo *P. brunneum* uma delas. Segundo os mesmos autores, as enzimas fúngicas têm a vantagem de serem secretadas extracelularmente. A capacidade dos fungos de penetrar em substratos compactados facilita o processo de hidrólise, pois são altamente adequados para fermentação a base de sólidos.

No que diz respeito às espécies produtoras de amilase eficientes, Gupta et al., (2003) e Hussain et al., (2013) reportaram as espécies do gênero *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. kawachii* e *A. flavus*), bem como espécies de *Penicillium* (*P. brunneum*, *P. fellutanum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. janthinellum*, *P. camemberti* e *P. olsonii*) e outros fungos *Streptomyces rimosus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Cryptococcus flavus*, *Thermomonospora curvata* e *Mucor* sp., como bons produtores da enzima. Para Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, (2007), as fontes fúngicas utilizadas predominantemente para a produção comercial de  $\alpha$ -amilase são as linhagens de *Aspergillus* spp. com *A. oryzae*, *A. niger* e *A. awamori* sendo as espécies mais comuns na produção comercial.

### **2.3.1 Fisiologia da produção de amilase**

O metabolismo microbiano pode variar muito entre as espécies, assim, o controle das condições fisiológicas, que pode ser alcançado pela atuação dos componentes dos meios de cultivo, é uma estratégia utilizada em processos industriais. Gupta et al. (2003) e Gopinath et al. (2017) investigaram exaustivamente em seus estudos, os fatores físico-químicos que podem afetar a produção de  $\alpha$ -amilase em fermentação submersa (SmF) e fermentação em estado sólido (SSF), respectivamente. Dentre estes fatores, os autores destacam que os mais notáveis são a composição do meio de cultivo, pH do meio, concentração de fosfato, idade do inóculo, temperatura, aeração, fonte de carbono e fonte de nitrogênio. Os parâmetros ótimos no controle do processo, variam de acordo com a fonte microbiana, o produto final desejado, o método de fermentação empregado e muitos outros fatores. O papel de vários parâmetros físico-químicos, incluindo fonte de carbono e nitrogênio, fosfato,

íons metálicos, temperatura, pH e agitação foram estabelecidos na literatura (Gupta et al., 2003; Sundarram e Murthy, 2014).

### **2.3.1.1 Fontes de carbono e nitrogênio**

A amilase é uma enzima induzível e, geralmente é induzida na presença de amido, a principal fonte de muitas enzimas, seguidas de maltose, amilose, amilopectina, ciclodextrina, glicogênio e maltotriose. Contudo, a especificidade do substrato da amilase varia de um microrganismo para outro. A maioria dos dados disponíveis na literatura sobre a indução de amilase em diferentes linhagens de *Aspergillus oryzae* sugere que a molécula indutora geral é a maltose. Dados de outros autores explicam que há um aumento de 20 vezes na atividade enzimática quando maltose e amido foram usados como indutores em *Aspergillus oryzae* (Mørkeberg et al., 1995; Kelly e Fogartye, 1997; Gupta et al., 2003).

Para a produção de amilase, fontes de nitrogênio orgânico têm sido predominantes, conforme relatado por Spohr et al., (1997). Extrato de levedura tem sido utilizado na produção de amilases de *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp. e *Halomonas meridiana* (Gupta et al., 2003). O extrato de levedura também foi utilizado em conjunto com outras fontes de nitrogênio, como a peptona no caso de *Bacillus* sp., sulfato de amônio no caso de *Bacillus subtilis* e farinha de soja e extrato de carne para *Aspergillus oryzae*. O extrato de levedura aumentou a produtividade de amilase em 156% em *Aspergillus oryzae* quando usado como fonte adicional de nitrogênio, do que quando amônia foi utilizada como fonte única (Agger et al., 1998; Gupta et al., 2003).

Hillier et al., (1997) reforçaram, em seus trabalhos, que várias outras fontes de nitrogênio orgânico também foram utilizadas para aprimorar a produção máxima de amilase, por várias espécies de bactérias e fungos. No entanto, fontes de nitrogênio orgânico, extrato de carne bovina e peptona, suportaram a produção máxima de amilase em linhagens bacterianas, enquanto farelo de soja e aminoácidos, favoreceram a produção da enzima em estudos com *Aspergillus oryzae*.

### 2.3.1.2 Temperatura e pH

A temperatura utilizada em um processo fermentativo pode ser considerado o principal fator relacionado a uma boa produção enzimática. Existem duas temperaturas que precisam estar na faixa ideal durante a produção de amilase, a temperatura para o crescimento da fonte microbiana e a temperatura ideal na qual ocorre a produção máxima de enzima. Ademais, a temperatura ideal para a atividade da amilase está relacionada ao crescimento do microrganismo. A temperatura ideal para produção de amilase reportada na literatura é de 25 a 30 °C para *Fusarium oxysporum* ao passo que, temperaturas mais elevadas podem ser utilizadas em processos fermentativos que empregam outras linhagens microbianas termofílicas (Gupta et al., 2003).

Entre os fungos, a maioria dos estudos de produção de amilase foi realizada com fungos mesofílicos na faixa de temperatura de 25 a 35 °C. Os rendimentos ótimos de amilase foram alcançados em faixa de temperatura de 30 a 37 °C para *Aspergillus oryzae*. Estudos de Jensen, et al. (1992) e Bunni, et al. (1989), revelam que a produção ideal de amilase está entre 50 e 55 °C para as culturas de fungos termofílicos como *Talaromyces emersonii*, *Thermomonospora fusca* e *Thermomyces lanuginosus*. Por outro lado, as amilases produzidas por bactérias como no caso do termococcus, são ativas de maneira ideal a temperaturas próximas a 80 °C. As enzimas de *Pyrococcus*, conforme supracitado, são otimamente ativas em altas temperaturas, em torno de 100 °C (Ray, Jana e Nanda, 1995; Gupta et al., 2003; Upgade, Nandeshwar e Samant, 2011).

A produção de enzimas aumenta com o aumento da temperatura até atingir o ideal. Com o aumento adicional da temperatura, a produção de enzimas diminui. Isso pode ser devido à perda de umidade no meio que afeta adversamente as atividades metabólicas dos microrganismos, levando a um crescimento reduzido e um declínio na produção de enzimas bem como ao início da denaturação de proteínas (Thippeswamy, Girigowda e Mulimani, 2006; Prakasham et al., 2007).

O pH ideal é um fator crítico para a estabilidade da enzima produzida. O pH do meio de crescimento, desempenha um papel importante ao induzir alterações morfológicas no organismo e na secreção enzimática. O pH ótimo das amilases varia de 2 a 12 (Saranraj e Stella, 2013). A mudança de pH

observada durante o crescimento do organismo também afeta a estabilidade do produto no meio.

Nos processos fermentativos utilizando células fúngicas, a capacidade de tamponamento de alguns constituintes do meio, às vezes elimina a necessidade de controle do pH. O valor do pH também serve como um indicador valioso do início e fim da síntese enzimática (Gupta et al., 2003). De acordo com Djekrif-Dakhmouche et al., (2006), fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* como *A. oryzae*, *A. ficuum* e *A. Niger*, exibem produção ideal em pH 5,0-6,0 em SmF, enquanto leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *S. kluyveri*, apresentaram rendimento máximo da enzima em pH 5,0 (Knox et al., 2004) e pH 7,0 (Ashraf et al., 2005), respectivamente. Foi relatado que uma linhagem de *Aspergillus oryzae*, acumulou amilase no micélio quando cultivado em meio deficiente em fosfato ou sulfato, por outro lado, a enzima foi liberada do micélio, quando o experimento foi conduzido em pH alcalino (Gupta et al., 2003; El-Safey e Ammar, 2004).

### **2.3.1.3 Aeração, agitação e íons inorgânicos**

A intensidade da agitação influencia as taxas de mistura e transferência de oxigênio em muitas fermentações fúngicas e, portanto, influencia a morfologia micelial e a formação do produto. Intensidades de agitação de até 300 rpm, têm sido normalmente empregadas para a produção de amilase a partir de vários microrganismos, conforme relatado na literatura (Gupta et al., 2003). Naidu et Saranraj (2013), relataram que uma velocidade de agitação mais alta, às vezes é prejudicial ao crescimento micelial e, portanto, pode diminuir a produção de amilases.

A utilização de íons inorgânicos desempenha um importante papel regulador na síntese de metabólitos primários e secundários, podendo afetar o crescimento do organismo e a produção de enzimas, incluindo a  $\alpha$ -amilase. Essa regulação pode afetar diversos organismos, incluindo células procarióticas e eucarióticas. Chung et al. (1995) relataram um aumento significativo na produção enzimática, devido a sua melhora na termoestabilidade em linhagens de *Aspergillus oryzae*, quando o meio de cultivo foi suplementado com níveis de fosfato acima de 0,2 M (Chung et al., 1995).

Achados semelhantes afirmados por Jüsten et al., (1996), foram corroborados em uma linhagem bacteriana de *Bacillus amyloliquefaciens*, onde baixos níveis de fosfato resultaram em densidade celular severamente baixa e sem produção de  $\alpha$ -amilase. Por outro lado, altas concentrações de fosfato, foram inibidoras da produção da enzima por *B. amyloliquefaciens*.

Amilases produzidas por *A. oryzae* são inibidas na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por outro lado, íons como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , não apresentaram nenhum efeito na produção de amilase por *A. oryzae* (Ben Ali et al., 2006; Gupta et al., 2003). Em estudos realizados por Bocking et al., (1999),  $\text{Mg}^{2+}$  teve um papel importante na estabilidade enzimática, e a produção da enzima foi reduzida para 50%, quando o  $\text{Mg}^{2+}$  foi omitido do meio. Quando  $\text{Na}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  foram adicionados juntos no meio, houve uma estimulação coordenada da produção de amilases por *Bacillus* sp. A adição de zeólitos para controlar os íons amônio em *B. amyloliquefaciens* resultou em aumento do rendimento da amilase (Naidu et Saranraj, 2013). Uma relação inversa entre a produção de amilase e a taxa de crescimento foi observada para *Streptomyces* sp., na presença e ausência de  $\text{Co}^{2+}$ . A presença de  $\text{Co}^{2+}$  aumentou os níveis finais de biomassa em 13 vezes, embora com uma redução no rendimento enzimático (Cui et al., 1997; Gupta et al., 2003).

### 2.3.2 Importância biotecnológica das amilases

As amilases desempenham importantes papéis na área da biotecnologia com aplicações cada vez mais variadas: *i)* indústria alimentícia: obtenção de glicose a partir da liquefação do amido em produtos como pão, cerveja e outros tipos de bebidas alcoólicas e na ração animal; *ii)* indústria no papel; *iii)* indústria têxtil; *iv)* indústria de detergentes e produtos de limpeza; *v)* indústria farmacêutica e química, na produção de vitaminas e antibióticos. A comercialização de amilases é a mais antiga, com a primeira utilização em 1984, como um produto farmacêutico para o tratamento de distúrbios digestivos (Spier, 2005) (Tabela 1).

Tabela 1: Amilases utilizadas em vários segmentos industriais e suas aplicações

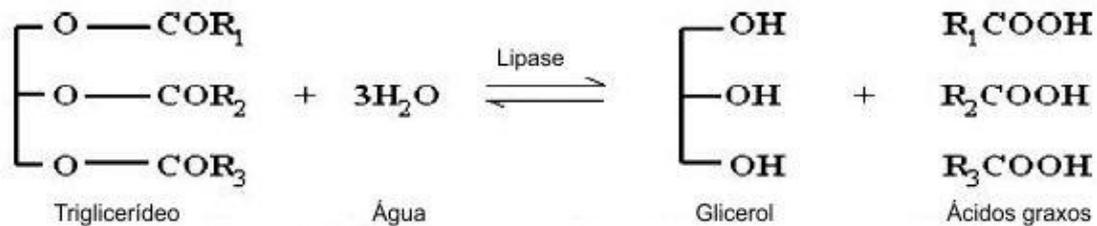
<b>Segmento industrial</b>	<b>Aplicação industrial</b>
<b>Detergente</b>	Remoção de manchas de amido
<b>Amido e combustíveis</b>	Liquefação e sacarificação do amido
<b>Panificação</b>	Suavidade e volume do pão, ajuste da farinha
<b>Bebida</b>	Tratamento de suco, cerveja de baixa caloria
<b>Têxtil</b>	Redimensionamento

Fonte: Kirk, Borchert e Fuglsang, (2002)

## 2.4 Diversidade microbiana das lipases

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases EC: 3.1.1.3), assim como as amilases, são enzimas onipresentes, encontradas em animais, plantas, fungos e bactérias, e possuem considerável significado fisiológico e potencial industrial. A função biológica da lipase é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis para fornecer ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Figura 3). As lipases possuem a característica única de atuar na interface entre uma fase aquosa e uma fase não aquosa. Elas sintetizam ésteres de glicerol e ácidos graxos de cadeia longa, quando a atividade da água é baixa (Akimoto, Nagashima e Sato, 1999; Aravindan, Anbumathi e Viruthagiri, 2007).

Figura 3: Hidrólise de triglicerídeos por lipase



Fonte: Singh e Mukhopadhyay, (2012).

Cihangir e Sarikaya (2004), salientam que alguns dos fungos produtores de lipase mais importantes comercialmente são reconhecidos como espécies pertencentes aos gêneros *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp. e *Rhizomucor* sp. A produção de lipase por fungos filamentosos varia de acordo com a linhagem, a composição do meio de cultivo, as condições de cultivo, o pH, a temperatura e o tipo de fontes de carbono e nitrogênio (Aravindan, 2007).

A demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características catalíticas, estimula o isolamento e a seleção de novas linhagens. Fungos produtores de lipase foram encontrados em diferentes habitats, como resíduos industriais, fábricas de processamento de óleo vegetal, fábricas de laticínios e solo contaminado com óleo, entre outros (Sharma et al. 2001). No trabalho realizado por Colen et al. (2006), foram isoladas 40 linhagens fúngicas produtoras de lipase do solo do norte do estado de Minas Gerais, através de técnicas de enriquecimento. Onze linhagens, dentre elas, a linhagem identificada como *Colletotrichum gloesporioides*, foi a mais produtiva. No entanto, uma cepa de *Aspergillus* sp., isolado de amostras de solo de diferentes regiões da Turquia, obteve maior produção de lipase, 24 UmL<sup>-1</sup> (Cihangir e Sarikaya 2004).

De acordo com Vakhlu e Kour (2006), as principais espécies terrestres de leveduras que produzem lipases são: *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Candida antarctica*, *Candida cylindracea*, *Candida parapsilopsis*, *Candida deformans*, *Candida curvata*, *Candida valida*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula pilimornae*, *Pichia bispora*, *Pichia mexicana*, *Pichiaivicola*, *Pichia xylosa*, *Pichia burtonii*, *Saccharomycopsis crataegensis*, *Torulaspora globosa* e *Trichosporon asteroides*.

No tocante à produção de lipase, foi relatado que uma linhagem de *Candida* sp., foi o produtor de lipase com o potencial mais elevado entre as leveduras (Tanet al.,2003). Já, He e Tan (2006), utilizaram uma cepa de *Candida* sp. 99-125, para otimizar a produção de lipase e, após a otimização, os autores relataram a atividade ótima de lipase de 6.230 e 9.600U mL<sup>-1</sup>, em frascos agitados e em um biorreator de 5 L, respectivamente. Do mesmo modo, Tan et al. (2003) atingiram uma atividade lipolítica máxima de 8.300 UmL<sup>-1</sup>, em um biorreator de 30 L, demonstrando assim, que os valores da atividade de lipase são altamente influenciados pelo microrganismo, substratos e condições operacionais.

#### **2.4.1 Fisiologia da produção de lipase**

As lipases microbianas são produzidas principalmente por cultura submersa, mas a fermentação em estado sólido também pode ser utilizada. Geralmente a produção de lipase é específica do organismo e é liberada durante a fase logarítmica ou estacionária tardia (Ghosh et al., 1996; Sharma, Chisti e Banerjee, 2001). O período de cultivo também varia de acordo com o microrganismo e as bactérias de rápido crescimento secretam lipase em 24 horas (Colen, 2006; Furini, 2017)

As lipases microbianas são principalmente extracelulares e sua produção é influenciada pela composição do meio, além de fatores físico-químicos, como temperatura, pH e oxigênio dissolvido. O principal fator relacionado a atividade enzimática foi relacionado como a fonte de carbono, uma vez que as lipases são enzimas induzíveis. Essas enzimas geralmente são produzidas na presença de um lipídio, como óleo ou qualquer outro indutor, como triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, sais biliares e glicerol (Gupta et al. 2004; Sharma et al. 2001; Sharma, Chisti e Banerjee, 2001).

##### **2.4.1.1 Fontes de carbono e nitrogênio**

As fontes de carbono servem como substratos importantes para a produção de energia para as células microbianas. Fontes de carbono lipídico, servem como indutores, e são geralmente essenciais para a obtenção de um alto rendimento das lipases. Benjamin e Pandey (1996), mostraram que a

produção de lipase por *Candida rugosa*, aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração de azeite, e a produção máxima foi alcançada com 10% (v/v) do substrato. A produção de uma lipase termoestável por uma linhagem de *Bacillus* sp., na presença de tripalmitina a 70 °C, foi descrito por Janssen et al. (1994). Lima et al. (2003), testaram meios com fontes de carbono de tripalmitina, tristearina e trimirristina, e verificaram que a tripalmitina foi o melhor indutor da atividade lipolítica.

No entanto, a exigência de glicose como fonte de carbono além de lipídios varia com o microrganismo. Geralmente, os meios suplementados com glicose, juntamente com triglicerídeos, estimularam a produção de lipase em *Rhizopus nigricans*, conforme relatado por Ghosh et al. (1996). Tanto o azeite quanto o Tween-80, estimularam a produção de lipase extracelular em *Penicillium citrinum* a 0,1 e 0,7% (v/v), respectivamente (Maliszewska e Mastalerz, 1992). Dalmau et al. (2000), mostraram que o Tween-80, estimulou a biossíntese de lipases e sua secreção em *Candida rugosa*. A lipase da linhagem de levedura *Pseudozyma hubeiensis* HB85A, foi fortemente estimulada em 150,8% na presença de Tween-80, em comparação com meios não suplementados com este composto (Bussamara et al., 2010).

Fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico têm sido tradicionalmente utilizadas para produção de lipase. Em *Aspergillus goneii*, *Mucor racemosus* e *Rhizopus nigricans*, o rendimento de lipase foi aumentado pela adição de peptona no meio de produção na concentração de 20 g L<sup>-1</sup> (Ghosh et al., 1996). No entanto, para a produção de lipase em *Rhodotorula glutinis*, fontes inorgânicas de nitrogênio, como fosfato de amônio, favoreceram a produção da enzima (Papaparaskevas et al., 1992). Salleh et al. (1993), obtiveram máxima produção de lipase extracelular em experimentos utilizando fungo termofílico, *R. Oryzae*, quando o meio foi suplementado com peptona como fonte de nitrogênio. Rajendran e Thangavelu (2009), verificaram que *R. arrhizus* exigiu extrato de peptona e levedura para a produção de lipase. No entanto, foi relatado que a fonte de nitrogênio inorgânico na forma de NH<sub>4</sub>Cl, foi melhor aproveitada no estudo utilizando *C. cylindracea* NRRL Y-17506 (Brozzoli et al., 2009) e *P. citrinum* (Miranda et al., 1999). Fontes de nitrogênio, como licor de milho e farelo de soja, estimularam a produção de lipase em estudos com *P.*

*Citrinum*, em um menor grau que a peptona, enquanto a uréia e o sulfato de amônio inibiram a síntese da enzima (Sztajer e Maliszewska, 1989).

#### 2.4.1.2 Temperatura e pH

A maioria dos organismos produtores de lipase, é de natureza mesofílica (crescendo em temperatura moderada, tipicamente entre 25 e 40 °C). No entanto, alguns organismos psicrófilicos e termofílicos foram relatados na literatura. A produção de lipase por uma cepa brasileira de *Penicillium simplicissimum*, mostrou atividade de 90 U g<sup>-1</sup> após 72 h de incubação na presença de resíduo da indústria de óleo de babaçu a 27 °C (Joseph et al., 2007).

Da mesma forma, o pH pode influenciar as atividades lipolíticas dos microrganismos. Sendo uma medida da acidez ou basicidade de um meio, o pH desempenha um papel importante na determinação do tipo de organismos que podem colonizar um substrato específico. Brozzoli et al. (2009), monitoraram a produção de lipase em um reator de tanque agitado de 3 L para avaliar os efeitos do pH médio na atividade da enzima em *Candida cylindracea*. Em pH constante de 6,5, a produção de lipase foi baixa (1,8 U mL<sup>-1</sup>), mas houve aumento significativo de até 18,7 U mL<sup>-1</sup> com pH não controlado, com um valor máximo de (20,4 U mL<sup>-1</sup>), quando o pH foi permitido variar livremente abaixo do pH 6.5. Nos trabalhos realizados por Colen et al., (2006), uma cepa mais produtiva identificada como *Colletotrichum gloesporioides*, apresentou atividade de lipase entre 27,7 e 27,4 U mL<sup>-1</sup>, quando cultivada em meio líquido agitado sob condições alcalinas na faixa de pH de 7,4 a 8,4. Geon-Ho et al. (2007), relataram que a lipase de *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-2178, foi produzida em condições alcalinas a pH 9,0.

A maioria das lipases que são ativas a pH extremamente ácido (pH 1,5 a 2,0), são principalmente de fontes de mamíferos, por exemplo lipase gástrica. No entanto, *Aspergillus niger* NCIM 1207, mostrou alto nível de lipase extracelular, quando cultivada em pH 2,5 (Mhetras et al., 2009). Além disso, microrganismos produtores de grande quantidade de lipase, como *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp. e *Rhizomucor* sp. (Treichel et al., 2010), *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp.

(Gupta et al., 2004), *Candida cylindracea* e *Yarrowia lipolytica* (Vakhlu e Kour, 2006), crescem e produzem lipases em faixas de pH de 6 a 8.

#### **2.4.1.3 Aeração, agitação e íons inorgânicos**

Aeração e agitação estão entre os fatores físicos que são importantes para melhorar e otimizar a produção de lipase. Assim, o crescimento de microrganismos e a produção de enzimas são afetados pela agitação e aeração, com base no suprimento de oxigênio durante o processo de produção da enzima, especialmente em biorreatores. Fickers et al. (2006), estudaram a produção de lipase em uma linhagem de *Yarrowia lipolytica*, em experimentos em um biorreator de 2000 L, contendo glicose a 1,5%, soro de leite em pó a 3%, extrato de levedura a 3%, licor de maceração de milho a 1%, azeite a 0,5% e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 0,8%. Os autores verificaram que a velocidade de agitação de 120 rpm e um fluxo de ar de 0,7 vvm a 29 °C, levaram a uma atividade lipolítica de aproximadamente 1100 U mL<sup>-1</sup>, após 53 h de fermentação.

Efeitos nos parâmetros de processo (aeração e agitação) na produção de lipase utilizando *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC 8737, em reator de tanque agitado de 1,5 L, com melaço como único meio de produção, foi estudado por Potumarthi et al. (2008). Foram exploradas várias aerações (1, 2 e 3 vvm), velocidades de agitação (100, 200 e 300 rpm) e concentração de melaço (1,0, 1,5 e 2,0%) sendo, a atividade máxima de lipase de 72 U mL<sup>-1</sup>, obtida após 96 h de fermentação a 2 vvm, 200 rpm, pH 7 e temperatura de 25 ± 2 °C, usando melaço a 1%. Sokolovska et al. (1998), utilizaram um fermentador em processo de batelada, para estudar os efeitos da aeração, natureza e concentração de substratos na produção de lipase extracelular por *C. cylindracea* CBS 6330. A saturação de oxigênio acima de 20% favoreceu a produção de lipase, portanto, um controle de fluxo combinado de ar (84 L h<sup>-1</sup>) e oxigênio (8,4 a 50,1 L h<sup>-1</sup>), foram utilizados a uma taxa de agitação de 500 rpm, temperatura de 30 °C e pH não controlado, com 10 g L<sup>-1</sup> de azeite para obter a melhor produção.

Estudo também enfatizam que diferentes microrganismos requerem diferentes minerais inorgânicos para o seu crescimento e produção de lipase. Sais inorgânicos na forma de MgSO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, BaCl<sub>2</sub>, foram necessários para a produção máxima de lipase por *Hendersonula toruloidea*

(Odibo et al., 1995). No caso de *Candida* sp. 99-125, o meio de cultura contendo (p/v) óleo de soja em 4,187%, pó de soja a 5,840%,  $K_2HPO_4$  em 0,284%,  $KH_2PO_4$  a 0,1%,  $(NH_4)_2SO_4$  em 0,1%,  $MgSO_4$  em 0,05% e Span 60 em 0,1%, foram reportados como sendo o ideal para a produção de lipase e, a ausência de qualquer um desses componentes, afetaram o crescimento e a atividade de lipase do organismo (He e Tan, 2006).

Geralmente, o sal de magnésio é exigido pela maioria dos microrganismos, devido à sua capacidade de desempenhar algumas funções reguladoras, associadas ao aumento do metabolismo da adenosina trifosfato e síntese de ácidos nucleicos (Bankar et al., 2009). Outros minerais necessários para o crescimento microbiano incluem, potássio, em cepas de leveduras (consideradas essenciais para a osmorregulação). Por outro lado, os íons ferros e cálcio, são essencialmente usados para a síntese de heme e citocromo (Venkateshwar et al., 2010), bem como para a estabilização e eficácia na atividade de lipase em *Acinetobacter* sp. (Snellman e Colwell, 2004), respectivamente.

#### 2.4.2 Importância biotecnológica das lipases

As lipases são usadas em duas maneiras distintas: como catalisador biológico para fabricar ingredientes alimentares e na produção de produtos químicos finos incluindo: *i*) as lipases são comumente utilizadas no processamento de gorduras e óleos; *ii*) processamento de alimentos, couro, produtos têxteis, detergentes e formulações desengordurantes; *iii*) fabricação de papel; *iv*) síntese de produtos químicos finos; *v*) produção de produtos farmacêuticos e cosméticos (Houde, Kademi e Leblanc, 2004) (Tabela 2).

Tabela 2: Lipases usadas em vários segmentos industriais e suas aplicações

<b>Segmento industrial</b>	<b>Aplicação industrial</b>
<b>Detergente</b>	Remoção de manchas lipídicas

<b>Alimentos</b>	Sabor de queijo
<b>Panificação</b>	Estabilidade e condicionamento da massa
<b>Polpa e papel</b>	Controle de resina de madeira, controle de contaminantes
<b>Gorduras e óleos</b>	Transesterificação Desengorduramento, produção de liso- lecitina
<b>Síntese orgânica</b>	Resolução de álcoois quirais e amidas
<b>Couro</b>	Decapagem

Fonte: Kirk, Borchert e Fuglsang, (2002)

## 2.5. Patenteamento na Biotecnologia

Por definição, uma patente é um acordo entre o proprietário de uma invenção e um determinado país, objetivando proteger a sua invenção, facilitando assim, a transferência de conhecimento e de tecnologias para o mercado. Economicamente, as patentes estimulam a inovação e a competitividade entre os países e dentro de um país (Hall et al. 2004; Kim e Lee, 2015).

Na área da biotecnologia, as buscas e pedidos pela aquisição de patentes são de suma importância para o desenvolvimento da indústria biotecnológica e da pesquisa, levando em consideração os custos, geralmente elevados, e o tempo gasto para concluir um determinado estudo (De Gênova, 2007).

Em 2005, a Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE), visando avaliar e padronizar a atividade de desenvolvimento dos países, definiu 30 códigos de Classificação Internacional de Patentes (CIP) para a área da biotecnologia (OCDE, 2005). Com base nesses códigos, em 2008, a Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI), fez uma classificação dos diferentes setores tecnológicos em 5 grandes áreas, subdivididas em 35 campos onde, a biotecnologia foi colocada

em um campo próprio, evitando assim, a sobreposição dos produtos biotecnológicos com produtos de outras áreas (OMPI, 2008).

Com as definições das CIPs, o Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), através de um estudo realizado em 2018, definiu 12 áreas de patentes da biotecnologia no Brasil. Assim, as áreas são: (i) microrganismos, enzimas e suas composições; (ii) medicamentos; (iii) fermentações e recuperação de subprodutos de fermentação; (iv) peptídeos; (v) medição e ensaio envolvendo enzimas ou microrganismos; (vi) análise de material biológico; (vii) agricultura; (viii) meio ambiente; (ix) aparelhos para enzimologia ou microbiologia; (x) alimentos e bebidas; (xi) nanobiotecnologia; e (xii) bibliotecas genômicas e proteômicas e seus aparatos. Entre essas áreas, a denominada “Microrganismos, enzimas e suas composições”, é a que contém a maior quantidade de documentos, sendo 860 documentos numa amostra de 1857 documentos (INPI, 2018).

Desta forma, o levantamento em plataformas como USPTO (Oficina de Patentes e Marcas dos Estados Unidos) e EPO (Oficina Europeu de Patentes) dos documentos e/ou patentes bem como dos trabalhos científicos já divulgados, objetivando um melhor entendimento no campo da biotecnologia sobre as enzimas amilase e lipase, produzidas por fungos recuperados de efluentes indústrias têxteis, ambiente potencialmente promissor na obtenção de enzimas biotecnológicas, poderá facilitar o entendimento do potencial biotecnológico que estas enzimas representam para o ramo industrial.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Levando em consideração a constante busca por novas moléculas biotecnologicamente promissoras no setor industrial, o objetivo deste trabalho consistiu na realização de um levantamento e discussão acerca das publicações e patentes relativas as enzimas lipases e amilases produzidas por fungos associados a amostras coletadas em efluentes industriais têxteis, a partir das plataformas NCBI-Pubmed, Scopus, Web of Science e bases de dados do INPI, EPO e UPSTO.

### 3.2 Objetivos específicos

- Levantamento de publicações sobre amilase e lipase produzidas por fungos recuperados de industrial têxtil a partir das plataformas acadêmicas NCBI-Pubmed, Web of Science e Scopus.
- Levantamento das patentes registradas em plataformas tecnológicas sobre amilase e lipase produzidas por fungos (recuperados de industrial têxtil ou não) no INPI, UPSTO e EPO por meio do repositório *Spacenet*.
- Avaliação quantitativa das publicações e patentes levantadas envolvendo as amilases e lipases nos últimos 10 anos.

### 4. Metodologia

A metodologia empregada no desenvolvimento do presente estudo consistiu em uma pesquisa analítico-exploratória em bases de dados digitais de artigos e de patentes tanto nacionais quanto internacionais. O levantamento dos artigos foi realizado nas plataformas do NCBI-Pubmed (*National Center for Biotechnology Information*), Web of Science e Scopus. Para as patentes, por sua vez, o delineamento da busca foi realizado a partir das bases de dados do INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) e do Spacenet, que congrega as bases de dados do USPTO (*United States Patent and Trademark Office*) e do EPO (*European Patent Office*). Foram considerados os dados a partir dos diferentes repositórios no intervalo de tempo de 01/01/2010 até 31/12/2019, os quais foram levantados da seguinte maneira:

**Etapa 1:** Definição de palavras-chave e combinações para a busca dos artigos e patentes.

Para o levantamento dos conteúdos nas plataformas supracitadas, foi utilizado uma sequência de palavras-chave atribuídas pelo autor a partir dos objetivos da pesquisa. Assim, as palavras-chave e combinações utilizadas na busca foram construídas de acordo com a tabela 3.

Tabela 3: Palavras-chave e combinações usadas para pesquisa em banco de dados tecnológicos e científicos.

<b>Combinações</b>	<b>Plataforma</b>
Bioprospecção (lipase E amilase)/ Bioprospecting (lipase AND amylase)	NCBI-Pubmed, Web of Science e Scopus
Bioprospecção (fungo E amilase OU lipase)/ Bioprospecting (fungi AND amylase OR lipase)	
Bioprospecção (fungo E indústria têxtil) / Bioprospecting (fungi AND textile industry)	
Bioprospecção (amilase E lipase OU indústria têxtil) / Bioprospecting (amylase AND lipase OR textile industry)	
Amilase E lipase/ amylase AND lipase Patente E amilase/ patent AND amylase	Spacenet e INPI
Patente E lipase/ patent AND lipase Patente E fungo/ patent AND fungal	
Indústria têxtil E (amilase OU lipase)/ textile industry AND (amylase OR lipase)	

**Etapa 2:** Procedimentos para a busca de dados nas plataformas.

Após definição dos termos de busca, os mesmos foram aplicados junto às plataformas NCBI-Pubmed, Web of Science, Scopus, Spacenet e INPI. Em seguida, foram aplicados filtros para limitar a curva temporal entre os anos de 2010 a 2019, bem como excluir dos resultados levantados, as publicações do tipo monografias, trabalhos de conclusão de curso, dissertações de mestrado, teses de doutorado, publicações em congressos e anais de eventos. Com relação a avaliação dos artigos científicos encontrados com a temática do trabalho, foi proposto a realização de um corte de periódicos com fator de impacto baixos, sendo assim, consideramos para a realização deste trabalho, índices de fatores de impactos (*JCR -Journal Citation Reports*), entre 1.0 a 2.5.

**Etapa 3:** Compilação dos dados obtidos

As informações concernentes às publicações levantadas nas pesquisas realizadas conforme procedimentos descritos na etapa 2, foram compiladas em duas tabelas (tabela 4 e tabela 5), nas quais foram relacionadas a quantidade de publicações obtidas com as palavras-chaves bem como a quantidade final após a realização dos cortes.

## 5. Resultados e discussão

O levantamento dos artigos foi realizado a partir do emprego de filtros para delimitação do tipo de publicação e do intervalo de tempo desejado, em combinação com as palavras-chaves, utilizando os conectores lógicos “AND” e “OR”, nos sítios eletrônicos das plataformas NCBI, Web of Science e Scopus. Para os últimos 10 anos, foram encontrados 136 artigos nas bases de dados, sendo que alguns dos artigos se encontraram em mais de uma plataforma. Em seguida, realizou-se uma seleção dos artigos em função dos índices de fatores de impactos JCR (1,0 a 2,5), bem como as áreas-foco da pesquisa em questão, o que reduziu o número de artigos a 30 (Tabela 4).

Tabela 4.: Busca de artigos publicados por palavras-chave nas bases de dados de Scopus, NCBI e Web of Science.

<b>Palavras chave</b>	<b>Scopus</b>	<b>NCBI</b>	<b>Web of Science</b>	<b>JCR entre 1.0 a 2.5</b>
<b>Bioprospecção (lipase E amilase) Bioprospecting (lipase AND amylase)</b>	20	11	13	14
<b>Bioprospecção (fungo E amilase OU lipase) Bioprospecting (fungi AND amylase OR lipase)</b>	13	24	12	9
<b>Bioprospecção (fungo E indústria têxtil) Bioprospecting (fungi AND textile industry)</b>	1	1	1	1
<b>Bioprospecção (amilase E lipase OU indústria têxtil) Bioprospecting (amylase AND lipase OR textile industry)</b>	11	14	15	6

Fonte: NCBI, Scopus e Web of Science, (2020)

A busca nas bases de dados das plataformas NCBI, Scopus e Web of Science, utilizando as palavras-chave “Bioprospecting (lipase AND amylase)”, nos forneceu dados de trabalhos acadêmicos (artigos científicos), obtidos a partir da pesquisa, os quais mostraram que a maioria das bioprospecções foram realizadas em locais com características extremas em relação a

temperatura e pH, como a encosta do Mar da Arábia Oriental (Farha e Hatha, 2019), solos desérticos em Sonora, México (Baqueiro-Peña et al. 2019), ambientes terrestres e marinhos da Antártica (Duarte et al. 2018), Golfo de Mannar, costa sudeste da Índia (Ananthan e Sathishkumar, 2016). Tais bioprospecções visaram a produção de enzimas termoestáveis (Geraldi et al. 2019) para diferentes fins, como aplicações na saúde humana (Rao e Kumavath, 2017) e a produção de DNA polimerase (Verma et al. 2015).

Análises críticas da literatura, mostram que os fungos filamentosos são os mais aptos a produzir essas enzimas na escala industrial, uma vez que o modo de crescimento em forma de hifas, permite uma melhor tolerância à pressão osmótica para a produção de enzimas em fermentação em estado sólido (Saranraj e Stella, 2013; Ahmad et al. 2019). Assim, para posterior restrição dos dados obtidos na pesquisa, foi acrescentado o termo “fungi” às palavras-chave supracitadas, selecionando apenas dados de amilases e lipases produzidas por fungos.

Durante o levantamento nos 3 bases de dados, com o uso das palavras-chave “Bioprospecting (amylase AND lipase OR textile industry)”, não foram encontrados artigos mencionando a produção de amilase ou lipase fúngicas oriundas de fungos bioprospectados em efluentes provenientes da indústria têxtil. Este fato pode ser considerado uma desvantagem para a busca de novas cepas fúngicas, visto que os efluentes da indústria têxtil, apresentam-se como um meio propício para o desenvolvimento de fungos filamentosos produtores de lipases e amilases, em decorrência das características apresentadas pelo meio em questão. Estes ambientes podem apresentar uma composição heterogênea, elevada carga de matéria orgânica, além de forte coloração, grande quantidade de sólidos suspensos, pH altamente flutuante, temperaturas altas, considerável quantidade de metais pesados, compostos organoclorados e materiais surfactantes (Bernal et al. 2020, *in press*). Contudo, foram encontrados artigos científicos mencionando o uso de enzimas fúngicas na remoção de poluentes encontrados em corpos d’água contaminados por efluentes da indústria têxtil (Upadhyay et al. 2016), ao se realizar a busca utilizando as palavras-chave “Bioprospecting (fungi AND textile industry)”.

Com relação a busca dos documentos relacionados as patentes referentes as plataformas tecnológicas Espacenet, o qual abriga o USPTO e EPO além de outros escritórios de registros de patentes, e o INPI, podemos dizer que foi possível encontrar um total de 238.382 registros de patentes. O escritório USPTO, apresentando o maior percentual de registros patentários (81,57%), seguido pelo EPO (18,37%) e por fim pelo INPI (0,06%), conforme verificável na Tabela 5 e Figura 4.

Tabela 5. Busca de registros de patentes por palavras-chave nas bases de dados do Espacenet e INPI para os 3 escritórios (USPTO, EPO e INPI).

<b>Palavras chave</b>	<b>USPTO</b>	<b>EPO</b>	<b>INPI</b>
<b>Amilase E lipase (Amylase AND Lipase)</b>	12656	3634	0
<b>Patente E amilase (Patent AND amylase)</b>	42815	8261	41
<b>Patente E lipase (Patent AND Lipase)</b>	32580	8718	49
<b>Patente e fungo (Patent AND Fungi)</b>	106388	23188	52
<b>Indústria têxtil E (amilase OU lipase)/ industry textile (amylase AND lipase) OR</b>	5025	631	28

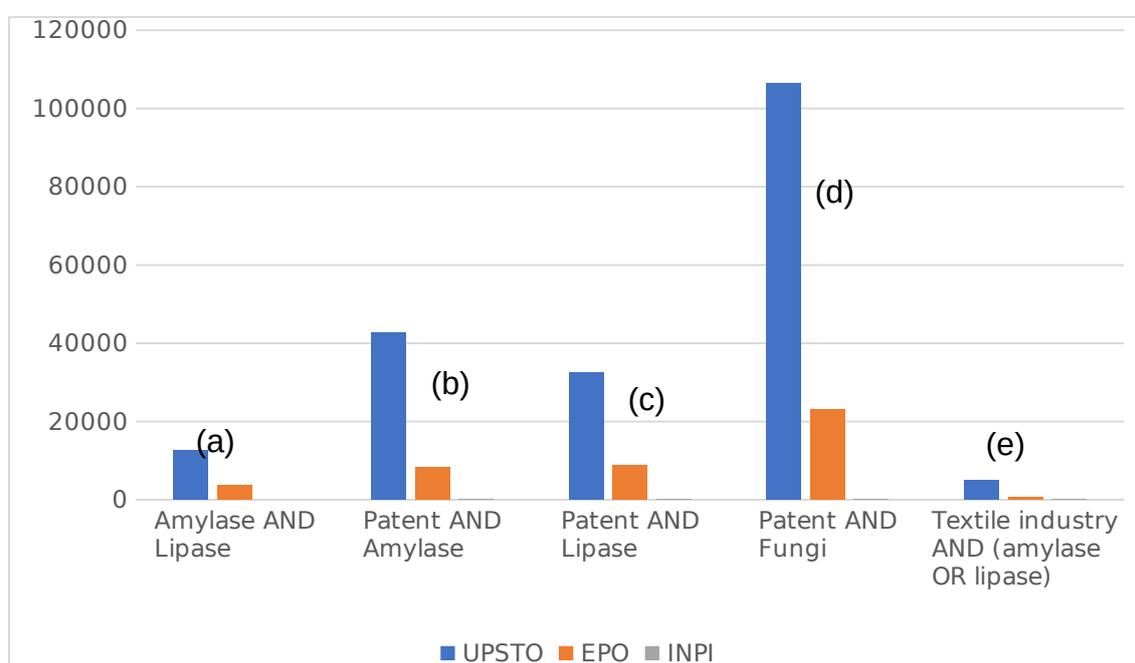
Fonte: USPTO, EPO e INPI (2020)

Ao analisar a figura 4, foi possível traçar um perfil abrangente dos 3 escritórios de registros de patentes do nosso estudo, em relação à produção de amilase e lipase por fungos filamentosos. Incontestavelmente, os EUA, através do USPTO, lideram o ranking das patentes no cenário do nosso estudo como era esperado, pois os EUA detêm a maior economia do mundo, com um PIB de 21,3 trilhões de dólares, detentor do escritório de patentes mais famoso e requisitado em todo o mundo, o qual recebe milhões de pedidos de patentes todos os anos (Zhong-kai et al. 2008). Além disso, o elevado número de patentes registradas pelo USPTO, ainda pode ser explicado pelo fato de que

muitas empresas solicitantes de patentes registram seus pedidos junto ao UPSTO e ao EPO concomitantemente (Kim e Lee, 2015).

Os registros de patentes exclusivas no escritório do EPO, possivelmente ocorreram em virtude do fato de que, as demandas de mercado para adoção de tais tecnologias, são encontradas na Europa em preeminência, em detrimento dos mercados americano e brasileiro (Kim e Lee, 2015).

Figura 4: Número de registros de patentes por país nos últimos 10 anos com as palavras-chave amylase AND lipase para os 3 escritórios (USPTO, EPO e INPI)



No que concerne ao INPI, por sua parte, nota-se que poucos pedidos de patentes foram realizados por empresas estrangeiras fora do Brasil e Universidades. Contudo, esse baixo número de patentes no INPI, não reflete o número de solicitações de patentes do Brasil nessa área, uma vez que, como muitos outros países, solicitantes de patentes brasileiros, por vezes, realizam os pedidos no USPTO (figura 6).

Os microrganismos contribuem consideravelmente na produção de enzimas e, segundo um relatório de mercado publicado por MarketsandMarkets (2020), o mercado de enzimas foi avaliado em 10 bilhões de dólares e têm uma previsão de crescimento de 14.7 bilhões até 2025. Dados apresentados por Rodrigues et al. (2020) reiteram a ideia, afirmando que os fungos são os

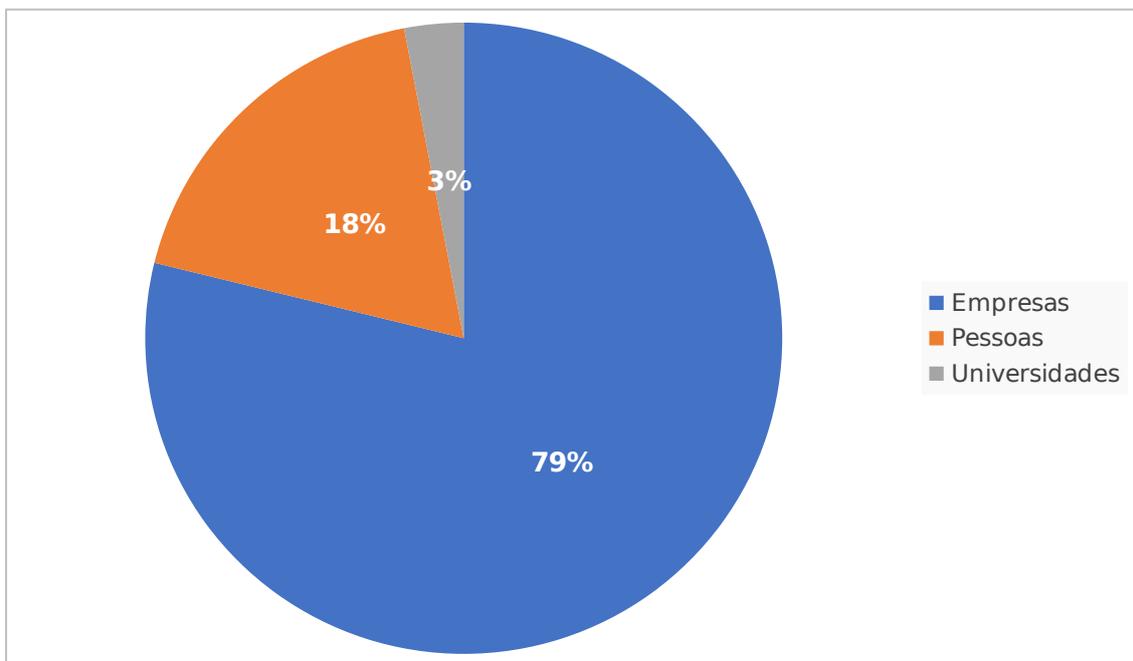
maiores contribuintes para esse crescimento, uma vez que 76.5% das patentes para produção de enzimas, utilizaram fungos como maquinaria de produção. Tais informações são ratificadas pelo gráfico de barras identificado pela letra (d) na figura 4, gerado por dados obtidos a partir do Espacenet e INPI, com as palavras-chave “Patent and Fungi”, o qual apresenta um número de patentes consideravelmente mais elevado, se comparado com os dados das demais pesquisas realizadas utilizando as palavras-chave “amylase and lipase”, “patent and amylase”, “patent and lipase” “textile industry AND (amylase OR lipase) (795,75%, 253,59%, 313,51%, 2 280,57% respectivamente).

Empresas públicas ou privadas, governos, universidades, centros de pesquisas e indivíduos podem ser depositantes de patentes (Hong, 2009). Em relação às amilases e lipases, observou-se que 79% das patentes são oriundas de empresas, 18% de pessoas e somente 3% derivadas das Universidades, como mostra a figura 5. A exorbitante porcentagem apresentada pelas empresas, expressam o desejo das mesmas de inovar e explorar o mercado de enzimas (da Rocha Lima et al., 2018). Embora seja pequena mais significativa, a porcentagem advinda das universidades, manifesta os esforços das Universidades em transformar o conhecimento em produtos que alcançam o mercado.

As aplicações dessas patentes abrangem vários campos, incluindo o campo farmacêutico, onde as enzimas amilase e lipase podem ser utilizadas em combinação, para o tratamento de desordens digestivas, insuficiência pancreática exócrina, pancreatite, fibrose cística e diabetes do tipo 1 e 2 (Fallon, 2010; Schuler e Schuler, 2011). Outras patentes relatam o uso de lipases de origem fúngica na panificação visando a substituir o DATEM, um emulsificante que fortalece a rede de glúten na massa (Colakoglu e Özkaya, 2012; Bellido, Gazzola e Matveeva, I, 2016). As aplicações incluem o uso dessas enzimas no meio ambiente como por exemplo para a prevenção e redução de biofilmes (Molobela et al., 2010, Deinhammer e Andersen, 2011; Esquenet et al., 2014). Essas enzimas também apresentam aplicações na indústria têxtil, onde são usadas para tingimento, descoloração enzimática de tecidos, uma vez que, tecidos branqueados por enzimas como amilases e lipases, apresentam maior absorção de corante, diminuição dos danos aos tecidos e/ou manuseio mais maciço e volumoso, em comparação com tecidos

branqueados por processos convencionais de branqueamento químico (Auterinen et al., 2012; Chang et al., 2012) (Figura 4 e).

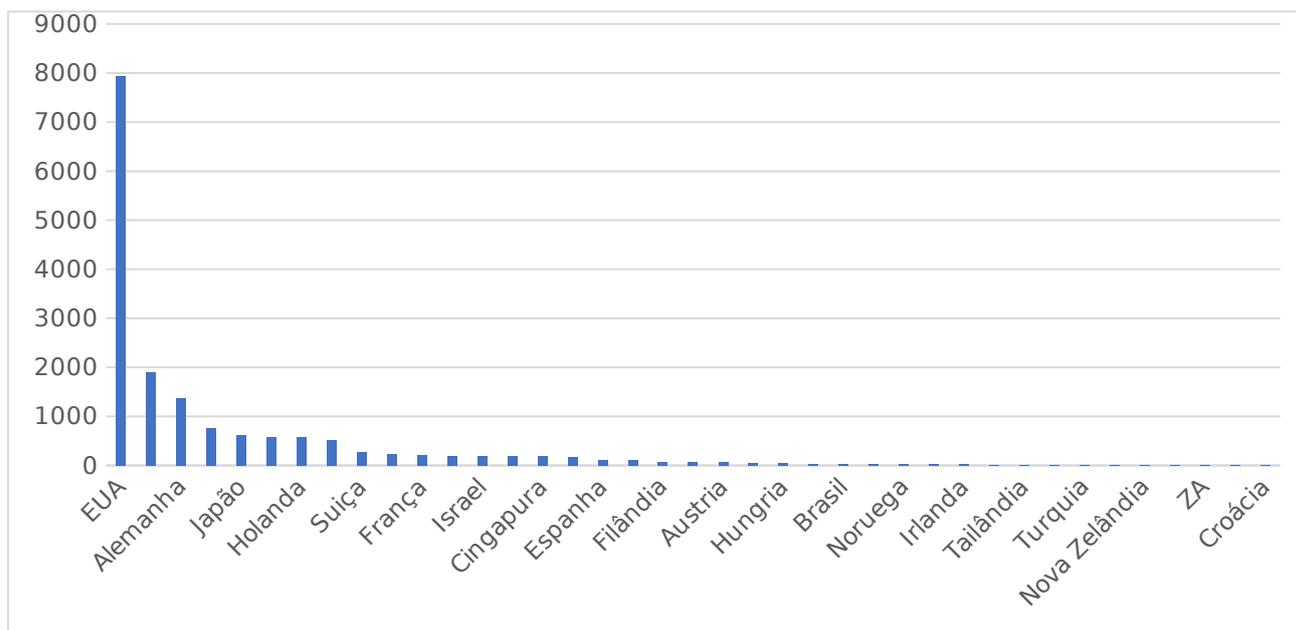
Figura 5: Porcentagem de registros de patentes pedidos por empresas, pessoas e indivíduos, nos últimos 10 anos. Dados do escritório do USPTO, pesquisados com as palavras-chave “Amylase AND Lipase”



Fonte: USPTO, EPO e INPI (2020)

Dados publicados por Li et al (2012), salientam que a demanda mundial por enzimas é atendida por cerca de 12 grandes produtores, cerca de 400 pequenos fornecedores. Outro dado importante do mercado enzimático, relata que, cerca de 75% do total das enzimas biotecnológicas, são produzidas por duas das principais empresas que atuam no ramo da produção enzimática, incluindo, a Novozymes, com sede na Dinamarca e a DuPont, com sede nos EUA. A existência dessas empresas nesses locais evidencia o porquê os EUA e a Dinamarca são dentre os países com mais publicações de patentes. Vale ressaltar que, outros países como Alemanha, Japão, Holanda e Suíça, que têm também a presença dessas empresas nos seus respectivos territórios, apresentam um número considerável de publicações de patentes (Figura 6).

Figura 6: Número de registros de patentes pedidos por país nos últimos 10 anos. Dados do escritório do USPTO pesquisados com as palavras-chave “Amylase AND Lipase”



Fonte: USPTO, EPO e INPI (2020)

## 7. Conclusão

A procura por registros de patentes mostrou que o escritório do INPI, possui poucos registros de patentes relacionadas a busca por novas fontes de amilases e lipases fúngicas, em comparação com o escritório do USPTO, o qual ocupa o primeiro lugar mundialmente, e do EPO que vem logo em seguida. No entanto, o baixo nível de registros de patentes não reflete o desenvolvimento da pesquisa brasileira dado que, em muitos casos, brasileiros registram suas patentes fora do Brasil.

Nos últimos 10 anos, houve em torno de 136 artigos relacionando os termos “bioprospecção”, “fungos”, “amilases” e “lipases”, o que demonstra uma busca ainda incipiente por novas fontes de cepas para produção de enzimas industriais com características de interesse. Destaca-se ainda que, os efluentes da indústria têxtil, apesar de ser uma ótima fonte para fungos adaptados a condições de estresse celular e a poluentes ambientais tóxicos, foram negligenciados junto ao registro de patentes, o que constitui-se ainda em uma lacuna na busca pela obtenção de enzimas termofílicas, termotolerantes e/ou tolerantes a flutuações de pH. O presente estudo sobre o levantamento de

informações científicas e tecnológicas, abre portas para novas explorações biotecnológicas, objetivando a busca por enzimas microbianas produzidas por células recuperadas de amostras industriais têxteis, para futuras aplicações industriais e acadêmicas.

## **8. Referências**

AASLYNG, Dorrit; GORMSEN, Erik; MALMOS, Henrik. **Mechanistic studies of proteases and lipases for the detergent industry.** Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v. 50, n. 3, p. 321-330, 1991.

ABADA, Emad Abd El-moniem. **Production and characterization of a mesophilic lipase isolated from *Bacillus stearothermophilus* AB-1.** Pakistan Journal of Biological Sciences, v. 11, n. 8, p. 1100-1106, 2008.

ABU, E. A.; ADO, S. A.; JAMES, D. B. **Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on sorghum pomace.** African journal of Biotechnology, v. 4, n. 8, p. 785-790, 2005.

ADEOLA, O.; COWIESON, A. J. **Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production.** Journal of animal science, v. 89, n. 10, p. 3189-3218, 2011.

AGGER, Teit et al. **Growth and product formation of *Aspergillus oryzae* during submerged cultivations: verification of a morphologically structured model using fluorescent probes.** Biotechnology and bioengineering, v. 57, n. 3, p. 321-329, 1998.

AHMAD, M. A. et al. **An overview of the enzyme: Amylase and its industrial potentials.** Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, v. 12, n. 1, p. 352-358, 2019.

AKIMOTO, Masamichi, NAGASHIMA, Yoshiko, et SATO, Daiki. **A kinetic study on lipase-catalyzed interesterification of soybean oil with oleic acid in a continuous packed-bed reactor.** Applied biochemistry and biotechnology, 1999, vol. 81, no 2, p. 131-142.

ANBU, Periasamy. **Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A).** International journal of biological macromolecules, 2013, vol. 56, p. 162-168.

ARAVINDAN, Rajendran, ANBUMATHI, Palanisamy, et VIRUTHAGIRI, Thangavelu. **Lipase applications in food industry.** 2007.

ASHRAF, Hamad, QADEER, M. A., IQBAL, Javed, et al. **Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*.** Bioresource technology, 2005, vol. 96, no 10, p. 1201-1204.

AUTERINEN, Anna-Liisa et al. **Enzymatic textile bleaching compositions and methods of use thereof.** U.S. Patent Application n. 13/063,140, 16 fev. 2012.

BANKAR, Sandip B., BULE, Mahesh V., SINGHAL, Rekha S., et al. **Optimization of *Aspergillus niger* fermentation for the production of glucose oxidase.** Food and Bioprocess Technology, 2009, vol. 2, no 4, p. 344.

BEAZELL, J. M., et al. **The effect of supplemental amylase on digestion.** Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1941, vol. 27, p. 308-319.

BECKS, S., BIELAWSKI, C., HENTON, D., et al. **THE APPLICATION OF A LIQUID STABLE AMYLASE REAGENT ON THE CIBA CORNING EXPRESS CLINICAL-CHEMISTRY SYSTEM.** In : Clinical Chemistry. 2101 L STREET NW, SUITE 202, WASHINGTON, DC 20037-1526 : AMER ASSOC CLINICAL CHEMISTRY, 1995. p. S186-S186.

BEN ALI, Mamdouh, KHEMAKHEM, Bassem, ROBERT, Xavier, et al. **Thermostability enhancement and change in starch hydrolysis profile of the maltohexaose-forming amylase of *Bacillus stearothermophilus* US100 strain.** Biochemical Journal, 2006, vol. 394, no 1, p. 51-56.

BELLIDO, Guillermo; GAZZOLA, Gianluca; MATVEEVA, Irina. **Method of producing a baked product with alpha-amylase, lipase and phospholipase**. U.S. Patent Application n. 14/781,164, 19 maio 2016.

BENJAMIN, Sailas et PANDEY, Ashok. **Optimization of liquid media for lipase production by *Candida rugosa***. Bioresource Technology, 1996, vol. 55, no 2, p. 167-170.

BERNAL, Suzan Prado Fernandes. **Avaliação do potencial Biotecnológico de bactérias e fungos isolados de uma estação de tratamento de Industria Têxtil**. 2020. Dissertação de Mestrado.

BISGAARD-FRANTZEN, H., BORCHERT, T., SVENDSEN, A., et al. PCT Patent Application. WO, 1995, vol. 95, p. 10603.

BOCKING, Sharon P., WIEBE, Marilyn G., ROBSON, Geoffrey D., et al. **Effect of branch frequency in *Aspergillus oryzae* on protein secretion and culture viscosity**. Biotechnology and bioengineering, 1999, vol. 65, no 6, p. 638-648.

BORNSCHEUER, Uwe Theo, et al. **Enzymes in lipid modification**. Weinheim : Wiley-VCH, 2000.

BURHAN, Arikan, NISA, Unaldi, GÖKHAN, Coral, et al. **Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolate ANT-6**. Process Biochemistry, 2003, vol. 38, no 10, p. 1397-1403.

BUSSAMARA, Roberta, FUENTEFRIA, Alexandre Meneghello, DE OLIVEIRA, Eder Silva, et al. **Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation**. Bioresource Technology, 2010, vol. 101, no 1, p. 268-275.

BUTLER, Clive S. et MASON, Jeremy R. **Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases**. In : Advances in microbial physiology. Academic Press, 1996. p. 47-84.

BROZZOLI, V., CROGNALE, S., SAMPEDRO, I., et al. **Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor**. Bioresource technology, 2009, vol. 100, no 13, p. 3395-3402.

BRUINENBERG, P. M., HULST, A. C., FABER, A., et al. **A process for surface sizing or coating of paper**. European Patent Application, 1996.

CAO, Linqiu, FISCHER, Andreas, BORNSCHEUER, Uwe T., et al. **Lipase-catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid esters**. Biocatalysis and Biotransformation, 1996, vol. 14, no 4, p. 269-283.

CARVALHO, Nayara Bezerra, DE SOUZA, Ranyere Lucena, DE CASTRO, Heizir F., et al. **Sequential production of amylolytic and lipolytic enzymes by bacterium strain isolated from petroleum contaminated soil**. Applied biochemistry and biotechnology, 2008, vol. 150, no 1, p. 25-32.

CARLILE, M.J., and WATKINSON, S.C. (1994). **The fungi**. New York: Academic Press.

CHAMBERGO, Felipe S. et VALENCIA, Estela Y. **Fungal biodiversity to biotechnology**. Applied microbiology and biotechnology, 2016, vol. 100, no 6, p. 2567-2577.

CHANDRA, Prem et al. **Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review**. Microbial Cell Factories, v. 19, n. 1, p. 1-42, 2020.

CHANG, Claudine Y. et al. **Variants of *Bacillus sp.* TS-23 alpha-amylase with altered properties**. U.S. Patent n. 8,153,412, 10 abr. 2012.

- CHERRY, Joel R. et FIDANTSEF, Ana L. **Directed evolution of industrial enzymes: an update.** Current opinion in biotechnology, 2003, vol. 14, no 4, p. 438-443.
- CHOI, Jung-Min, HAN, Sang-Soo, et KIM, Hak-Sung. **Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects.** Biotechnology advances, 2015, vol. 33, no 7, p. 1443-1454.
- CHOUDHURY, Payel et al. Performance improvement of microbial fuel cells for waste water treatment along with value addition: a review on past achievements and recent perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 372-389, 2017.
- CHUNG, Young Chul, KOBAYASHI, Tetsuo, KANAI, Haruhiko, et al. **Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus* DT5432.** Appl. Environ. Microbiol., 1995, vol. 61, no 4, p. 1502-1506.
- CIHANGIR, Nilüfer et SARIKAYA, Elif. **Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus sp.*** World journal of microbiology and biotechnology, 2004, vol. 20, no 2, p. 193-197.
- COLAKOGLU, Abdullah S.; ÖZKAYA, Hazım. **Potential use of exogenous lipases for DATEM replacement to modify the rheological and thermal properties of wheat flour dough.** Journal of Cereal Science, v. 55, n. 3, p. 397-404, 2012.
- COLEN, Gecernir, JUNQUEIRA, Roberto Gonçalves, et MORAES-SANTOS, Tasso. **Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, vol. 22, no 8, p. 881-885.
- COUTO, Susana Rodriguez et SANROMÁN, Ma Angeles. **Application of solid-state fermentation to food industry—a review.** Journal of Food Engineering, 2006, vol. 76, no 3, p. 291-302.
- CRUEGER, Wulf, CRUEGER, Anneliese, BROCK, Thomas D., et al. **Biotechnology: a textbook of industrial microbiology.** 1990.
- CUI, Y. Q., VAN DER LANS, R. G. J. M., et LUYBEN, K. Ch AM. **Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation.** Biotechnology and Bioengineering, 1997, vol. 55, no 5, p. 715-726.
- DA ROCHA LIMA, Amanda Dias; DE FARIAS, Vilmaria Albuquerque; DE OLIVEIRA, Hermógenes David. **Prospecção Tecnológica de Patentes Relativas a Proteases na Produção de Queijos.** Cadernos de Prospecção, v. 11, n. 5, p. 1726, 2018.
- DALMAU, E., MONTESINOS, J. L., LOTTI, M., et al. **Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*.** Enzyme and Microbial Technology, 2000, vol. 26, no 9-10, p. 657-663.
- DECASTRO, H. F. et ANDERSON, W. A. **Fine chemicals by biotransformation using lipases.** Química Nova, 1995, vol. 18, no 6, p. 544-554.
- DEINHAMMER, Randy; ANDERSEN, Carsten. **Methods for preventing, removing, reducing, or disrupting biofilm.** U.S. Patent Application n. 12/955,251, 5 maio 2011.
- DICK, Michael W. Fungi, flagella and phylogeny. Mycological Research, 1997, vol. 101, no 4, p. 385-394.
- DJEKRIF-DAKHMOCHE, S., GHERIBI-AOULMI, Z., MERAIHI, Z., et al. **Application of a statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder.** Journal of Food Engineering, 2006, vol. 73, no 2, p. 190-197.

EL-SAFEY, E. M. et AMMAR, M. S. **Purification and characteraization of  $\alpha$ amylase isolated from *Aspergillus falvus* var. *columnaris***. Ass. Univ. Bull. Environ. Res, 2004, vol. 7, no 1, p. 93-100.

ERDAL, SERKAN et TASKIN, MESUT. **Production of alpha-amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid-state fermentation using waste Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate**. Romanian Biotechnological Letters, 2010, vol. 15, no 3, p. 5342-5350.

ERIKSEN, Susanne Havn, JENSEN, Bo, et OLSEN, Jørgen. **Effect of N-linked glycosylation on secretion, activity, and stability of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus oryzae***. Current Microbiology, 1998, vol. 37, no 2, p. 117-122.

ERTUĞRUL, Sevgi, DÖNMEZ, Gönül, et TAKAÇ, Serpil. **Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity**. Journal of Hazardous Materials, 2007, vol. 149, no 3, p. 720-724.

ESQUENET, Marc B. et al. **Methods and enzymatic detergents for removing biofilm**. U.S. Patent Application n. 14/196,868, 11 set. 2014.

FALLON, Joan M. **Combination enzyme for cystic fibrosis**. U.S. Patent Application n. 12/786,739, 16 set. 2010.

FALONY, Gwen, ARMAS, Janny Coca, MENDOZA, Julio C. Dustet, et al. **Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation**. Food Technology & Biotechnology, 2006, vol. 44, no 2.

FARAHAT, S. M., RABIE, A. M., et FARAG, A. A. **Evaluation of the proteolytic and lipolytic activity of different *Penicillium roqueforti* strains**. Food chemistry, 1990, vol. 36, no 3, p. 169-180.

FINNERTY, W. R. **Microbial lipid metabolism**. Microbial lipids, 1989, vol. 2, p. 525-566.

FICKERS, Patrick, ONGENA, M. A. R. C., DESTAIN, Jacqueline, et al. **Production and downstream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica***. Enzyme and microbial technology, 2006, vol. 38, no 6, p. 756-759.

FLICKINGER, Michael C., DREW, Stephen W., et al. **Encyclopedia of bioprocess technology**. John Wiley, 1999.

FURINI, Graciane. **Produção de enzimas lipolíticas por bactérias isoladas de sistemas de tratamento biológico de efluentes**. 2017.

GIRI, N. Y., MOHAN, K. Raja, RAO, L. Venkateshwara, et al. **Immobilization of  $\alpha$ -amylase complex in detection of higher oligosaccharides on paper**. Current Science, 1990, vol. 59, no 24, p. 1339-1340.

GOPINATH, Subash CB, ANBU, Periasamy, ARSHAD, M. K., et al. **Biotechnological processes in microbial amylase production**. BioMed research international, 2017, vol. 2017. Ghosh PK, Saxena RK, Gupta R, Yadav RP, Davidson S (1996). **Microbial lipases: production and applications**. Sci. Prog. 79(2):119-157.

GHORI, M. I., IQBAL, M. J., et HAMEED, A. **Characterization of a novel lipase from *Bacillus* sp. isolated from tannery wastes**. Brazilian Journal of Microbiology, 2011, vol. 42, no 1, p. 22-29.

GRAVESEN, Suzanne, FRISVAD, Jens C., SAMSON, Robert A., et al. **Microfungi**. Munksgaard International Publishers Ltd, 1994.

- GUPTA, Rani, GIGRAS, Paresh, MOHAPATRA, Harapriya, et al. **Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective**. Process biochemistry, 2003, vol. 38, no 11, p. 1599-1616.
- GUTARRA, Melissa LE, GODOY, Mateus G., MAUGERI, Francisco, et al. **Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation**. Bioresource technology, 2009, vol. 100, no 21, p. 5249-5254.
- GUZMÁN-MALDONADO, Horacio, PAREDES-LÓPEZ, Octavio, et BILIADERIS, Costas G. **Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review**. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 1995, vol. 35, no 5, p. 373-403.
- HAAS, Michael J. et FOGLIA, T. A. **Alternate feedstocks and technologies for biodiesel production**. The biodiesel handbook, 2005, vol. 42.
- HAKI, G. D. et RAKSHIT, S. K. **Developments in industrially important thermostable enzymes: a review**. Bioresource technology, 2003, vol. 89, no 1, p. 17-34.
- HAMER, R. J. Enzymes in the baking industry. In : **Enzymes in food processing**. Springer, Boston, MA, 1995. p. 190-222.
- HASAN, Fariha, SHAH, Aamer Ali, et HAMEED, Abdul. **Industrial applications of microbial lipases**. Enzyme and Microbial technology, 2006, vol. 39, no 2, p. 235-251.
- HE, Yao-Qiang et TAN, Tian-Wei. **Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida sp.* 99-125**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, vol. 43, no 1-4, p. 9-14.
- HEBEDA, RONALD E., NAGODAWITHANA, T., et REED, G. **Starches, sugars, and syrups**. Enzymes in food processing, 1993, p. 321-343.
- HENDRIKSEN, H. V., PEDERSEN, S., et BISGARD-FRANTZEN, H. **A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches**. Patent application WO, 1999, vol. 99, p. 35325.
- HILLIER, P., WASE, D. A. J., EMERY, A. N., et al. **Instability of  $\alpha$ -amylase production and morphological variation in continuous culture of *Bacillus amyloliquefaciens* is associated with plasmid loss**. Process Biochemistry, 1997, vol. 32, no 1, p. 51-59.
- HOLKAR, Chandrakant R., JADHAV, Ananda J., PINJARI, Dipak V., et al. **A critical review on textile wastewater treatments: possible approaches**. Journal of environmental management, 2016, vol. 182, p. 351-366.
- HONG, Soonwoo. The magic of patent information. **World Intellectual Property Organization, [www.wipo.int/sme/en/documents/patent\\_information.htm](http://www.wipo.int/sme/en/documents/patent_information.htm)**, 2009.
- HONG, T. D., ELLIS, R. H., et MOORE, D\_. **Development of a model to predict the effect of temperature and moisture on fungal spore longevity**. Annals of Botany, 1997, vol. 79, no 2, p. 121-128.
- HOUDE, Alain, KADEMI, Ali, et LEBLANC, Danielle. **Lipases and their industrial applications**. Applied biochemistry and biotechnology, 2004, vol. 118, no 1-3, p. 155-170.
- HUSSAIN, Iftikhar, SIDDIQUE, Faisal, MAHMOOD, Muhammad Shahid, et al. **A Review of the Microbiological Aspect of  $\alpha$ -amylase Production**. International Journal of Agriculture & Biology, 2013, vol. 15, no 5.
- ISO, Mamoru, CHEN, Baoxue, EGUCHI, Masashi, et al. **Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001, vol. 16, no 1, p. 53-58.

- JAEGER, K. E., DIJKSTRA, B. W., et REETZ, M. T. **Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases.** Annual Reviews in Microbiology, 1999, vol. 53, no 1, p. 315-351.
- JAEGER, K. E. Eggert. T.(2002). **Lipases for biotechnology.** Curr. Opin. Biotechnol, vol. 13, no 4, p. 390-397.
- JANSSEN, Peter H., MONK, Colin R., et MORGAN, Hugh W. **A thermophilic, lipolytic *Bacillus sp.*, and continuous assay of its p-nitrophenyl-palmitate esterase activity.** FEMS Microbiology Letters, 1994, vol. 120, no 1-2, p. 195-200.
- JIN, Bo, VAN LEEUWEN, J. Hans, et PATEL, B. **Mycelial morphology and fungal protein production from starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*.** Process Biochemistry, 1999, vol. 34, no 4, p. 335-340.
- JOSEPH, Babu, RAMTEKE, Pramod W., THOMAS, George, et al. **Cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications.** Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 2007, vol. 2, no 2, p. 39-48.
- JÜSTEN, P., PAUL, G. C., NIENOW, A. W., et al. **Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity.** Biotechnology and Bioengineering, 1996, vol. 52, no 6, p. 672-684.
- KATHIRESAN, K. et MANIVANNAN, S. **-Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil.** African journal of Biotechnology, 2006, vol. 5, no 10.
- KASTURE, N. S. **Bioremediation of nitro-aromatics: an overview.** International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology, 2017, vol. 2, no 5.
- KELLY, C. T., BOLTON, D. J., et FOGARTY, W. M. **Bi-phasic production of  $\alpha$ -amylase of *Bacillus flavothermus* in batch fermentation.** Biotechnology letters, 1997, vol. 19, no 7, p. 675-677.
- KENDRICK, B. **The Fifth Kingdom.** Newburyport. 2000.
- KHEHRA, Manjinder Singh, SAINI, Harvinder Singh, SHARMA, Deepak Kumar, et al. **Biodegradation of azo dye CI Acid Red 88 by an anoxic-aerobic sequential bioreactor.** Dyes and Pigments, 2006, vol. 70, no 1, p. 1-7.
- KIRAN, G. Seghal, SHANMUGHAPRIYA, S., JAYALAKSHMI, J., et al. **Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas sp.* (MSI057).** Bioprocess and Biosystems Engineering, 2008, vol. 31, no 5, p. 483-492.
- KIRK, Ole, BORCHERT, Torben Vedel, et FUGLSANG, Claus Crone. **Industrial enzyme applications.** Current opinion in biotechnology, 2002, vol. 13, no 4, p. 345-351.
- KNOX, Alison M., DU PREEZ, James C., et KILIAN, Stephanus G. **Starch fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains transformed with amylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fibuligera*.** Enzyme and Microbial Technology, 2004, vol. 34, no 5, p. 453-460.
- KONSOULA, Zoe et LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, Maria. **Co-production of  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates.**
- KUNAMNENI, Adinarayana, PERMAUL, Kugen, et SINGH, Suren. **Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*.** Journal of bioscience and bioengineering, 2005, vol. 100, no 2, p. 168-171.

- KOTTWITZ, B., UPADEK, H., et CARRER, G. **Application and benefits of enzymes in detergents**. *Chimica oggi*, 1994, vol. 12, no 11-12, p. 21-24.o 7, p. 675-677.
- KULKARNI, Neelima et GADRE, R. V. **A novel alkaline, thermostable, protease-free lipase from *Pseudomonas sp.*** *Biotechnology Letters*, 1999, vol. 21, no 10, p. 897-899.
- KRAMER, W. **The potential of biodiesel production**. *Oils and Fats Int*, 1995, vol. 11, p. 33-34. *Bioresource Technology*, 2007, vol. 98, no 1, p. 150-157.
- LADERMAN, Kenneth A., DAVIS, Bradley R., KRUTZSCH, Henry C., et al. **The purification and characterization of an extremely thermostable alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus***. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, vol. 268, no 32, p. 24394-24401.
- LEE, Geon-Ho, BAE, Jae-Han, SUH, Min-Jung, et al. **New finding and optimal production of a novel extracellular alkaline lipase from *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-2178**. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2007, vol. 17, no 6, p. 1054.
- LEE, S., Rhee, J., 1993. **Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3 SK**. *Enzyme Microbiol. Technol.* 15, 617–623.
- LI, Shuang et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 2, n. 3, p. e201209017, 2012.
- LI, Chao, ZHANG, Zhen, LI, Yi, et al. **Study on dyeing wastewater treatment at high temperature by MBBR and the thermotolerant mechanism based on its microbial analysis**. *Process Biochemistry*, 2015, vol. 50, no 11, p. 1934-1941.
- LI, Hong, SHEN, Benxian, KABALU, J. C., et al. **Enhancing the production of biofuels from cottonseed oil by fixed-fluidized bed catalytic cracking**. *Renewable Energy*, 2009, vol. 34, no 4, p. 1033-1039.
- LIMA, Valéria MG, KRIEGER, Nadia, SARQUIS, Maria Inez M., et al. **Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum***. *Food Technology and Biotechnology*, 2003, vol. 41, no 2, p. 105-110.
- LIMA, V. M. G., KRIEGER, N., MITCHELL, D. A., et al. **Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents**. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, vol. 18, no 1, p. 65-71.
- LIN, Long-Liu, CHYAU, Charng-Cherng, et HSU, Wen-Hwei. **Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.* TS-23**. *Biotechnology and applied biochemistry*, 1998, vol. 28, no 1, p. 61-68.
- LIU, Weizhong et SUNDHEIM, Leif. **Nitrate nonutilizing mutants and vegetative compatibility groups in *Fusarium poae***. *Fungal Genetics and Biology*, 1996, vol. 20, no 1, p. 12-17.
- MAHADIK, Nutan D., PUNTAMBEKAR, Ulka S., BASTAWDE, Kulbhushan B., et al. **Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation**. *Process Biochemistry*, 2002, vol. 38, no 5, p. 715-721.
- MAHESHWARI, Ramesh, BHARADWAJ, Girish, et BHAT, Mahalingeshwara K. **Thermophilic fungi: their physiology and enzymes**. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, vol. 64, no 3, p. 461-488.
- MALISZEWSKA, Irena et MASTALERZ, Przemyslaw. **Production and some properties of lipase from *Penicillium citrinum***. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992, vol. 14, no 3, p. 190-193.

- MASSE, L., KENNEDY, K. J., et CHOU, S. **Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater.** Bioresource Technology, 2001, vol. 77, no 2, p. 145-155.
- MATSUMOTO, T., TAKAHASHI, S., KAIEDA, M., et al. **Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production.** Applied microbiology and biotechnology, 2001, vol. 57, no 4, p. 515-520.
- MHETRAS, N. C., BASTAWDE, K. B., et GOKHALE, D. V. **Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207.** Bioresource technology, 2009, vol. 100, no 3, p. 1486-1490.
- MICHELIN, Michele, SILVA, Tony M., BENASSI, Vivian M., et al. **Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*.** Carbohydrate research, 2010, vol. 345, no 16, p. 2348-2353.
- MIRANDA, O. A., SALGUEIRO, A. A., PIMENTEL, M. C. B., et al. **Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue.** Bioresource technology, 1999, vol. 69, no 2, p. 145-147.
- MOJSOV, Kiro. **Microbial alpha-amylases and their industrial applications: a review.** International Journal of Management, IT and Engineering (IJMIE), 2012, vol. 2, no 10, p. 583-609.
- MOLOBELA, Itumeleng Phyllis; CLOETE, Thomas Eugene; BEUKES, Mervyn. **Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria.** 2010.
- MONFORT, Aurelia, BLASCO, Amalia, PRIETO, Jose Antonio, et al. **Combined Expression of *Aspergillus nidulans* Endoxylanase X24 and *Aspergillus oryzae* (alpha)-Amylase in Industrial Baker's Yeasts and Their Use in Bread Making.** Appl. Environ. Microbiol., 1996, vol. 62, no 10, p. 3712-3715.
- MØRKEBERG, Rikke, CARLSEN, Morten, et NIELSEN, Jens. **Induction and repression of  $\alpha$ -amylase production in batch and continuous cultures of *Aspergillus oryzae*.** Microbiology, 1995, vol. 141, no 10, p. 2449-2454.
- NAIDU, M. A. et SARANRAJ, P. **Bacterial amylase: a review.** Int J Pharm Biol Arch, 2013, vol. 4, no 2, p. 274-287.
- NAJAFI, Mohsen Fathi, DEOBAGKAR, Dileep, et DEOBAGKAR, Deepti. **Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* AX20.** Protein expression and purification, 2005, vol. 41, no 2, p. 349-354.
- NIELSEN, Anders D., PUSEY, Marc L., FUGLSANG, Claus C., et al. **A proposed mechanism for the thermal denaturation of a recombinant *Bacillus halmapalus*  $\alpha$ -amylase—the effect of calcium ions.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2003, vol. 1652, no 1, p. 52-63.
- ODIBO, F. J. C., OKEREKE, U. O., et OYEKA, C. A. **Influence of culture conditions on the production of lipase of *Hendersonula toruloidea*.** Bioresource technology, 1995, vol. 54, no 1, p. 81-83.
- PAPAPARASKEVAS, Dimitris, CHRISTAKOPOULOS, Paul, KEKOS, Dimitris, et al. **Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*.** Biotechnology Letters, 1992, vol. 14, no 5, p. 397-402.

- PANDEY, Ashok, BENJAMIN, Sailas, SOCCOL, Carlos R., et al. **The realm of microbial lipases in biotechnology**. *Biotechnology and applied biochemistry*, 1999, vol. 29, no 2, p. 119-131.
- PARALES, Rebecca E. et HADDOCK, John D. **Biocatalytic degradation of pollutants**. *Current opinion in biotechnology*, 2004, vol. 15, no 4, p. 374-379.
- PAUL, DIPAK. **Microorganisms and  $\alpha$ -amylase: a concise review**. *Inov J Life Sci*, v. 4, p. 1-5, 2016.
- POTUMARTHI, Ravichandra, SUBHAKAR, Chennupati, VANAJAKSHI, J., et al. **Effect of aeration and agitation regimes on lipase production by newly isolated *Rhodotorula mucilaginosa*–MTCC 8737 in stirred tank reactor using molasses as sole production medium**. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2008, vol. 151, no 2-3, p. 700-710.
- PRAKASHAM, R. S., SUBBA RAO, Ch, SREENIVAS RAO, R., et al. **Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori***. *Journal of applied microbiology*, 2007, vol. 102, no 1, p. 204-211.
- PRIETO, Jose Antonio, BORT, Bernardo Roque, MARTÍNEZ, Javier, et al. **Purification and characterization of a new  $\alpha$ -amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae***. *Biochemistry and Cell Biology*, 1995, vol. 73, no 1-2, p. 41-49.
- PROLO, Thaiane et al. **BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE PROTEASES: POTENCIAL PROTEOLÍTICO DE *Fusarium oxysporum***. 2015.
- RAJAN, M. **Global market for industrial enzymes to reach \$2.4 million by 2009**. Business Communications Company, RC-147U Enzymes for Industrial Applications, 2004.
- RAJENDRAN, Aravindan, PALANISAMY, Anbumathi, et THANGAVELU, Viruthagiri. **Evaluation of medium components by Plackett-Burman statistical design for lipase production by *Candida rugosa* and kinetic modeling**. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, vol. 24, no 3, p. 436-444.
- RAJENDRAN, Aravindan et THANGAVELU, Virutz **Optimization and modeling of process parameters for lipase production by *Bacillus brevis***. *Food and bioprocess technology*, 2012, vol. 5, no 1, p. 310-322.
- RAY, R. R., JANA, S. C., et NANDA, G. **Immobilization of  $\beta$ -amylase from *Bacillus megaterium* B6 into gelatin film by cross-linking**. *Journal of applied bacteriology*, 1995, vol. 79, no 2, p. 157-162.
- SAKTHI, S. Siva, KANCHANA, D., SARANRAJ, P., et al. **Evaluation of amylase activity of the amyolytic fungi *Aspergillus niger* using cassava as substrate**. *International Journal of Applied Microbiology Science*, 2012, vol. 1, p. 24-34.
- SANKARAN, Sindhuja, KHANAL, Samir Kumar, JASTI, Nagapadma, et al. **Use of filamentous fungi for wastewater treatment and production of high value fungal byproducts: a review**. *Critical reviews in environmental science and technology*, 2010, vol. 40, no 5, p. 400-449.
- SALLEH, A. Ben, MUSANI, R., BASRI, M., et al. **Extra-and intra-cellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production**. *Canadian journal of microbiology*, 1993, vol. 39, no 10, p. 978-981.
- SARANRAJ, P. et STELLA, D. **Fungal amylase—a review**. *International Journal of Microbiological Research*, 2013, vol. 4, no 2, p. 203-211.
- SAXENA, R. K., SHEORAN, Anita, GIRI, Bhoopander, et al. **Purification strategies for microbial lipases**. *Journal of microbiological methods*, 2003, vol. 52, no 1, p. 1-18.

SCHULER, Christopher; SCHULER, Edward. **Composition with a fungal (yeast) lipase and method for treating lipid malabsorption in cystic fibrosis as well as people suffering from pancreatic lipase insufficiency**. U.S. Patent n. 8,071,089, 6 dez. 2011.

SEITZ, Eugene W. **Industrial application of microbial lipases: a review**. Journal of the American oil chemists' society, 1974, vol. 51, no 2, p. 12-16.

SHARMA, Rohit, CHISTI, Yusuf, et BANERJEE, Uttam Chand. **Production, purification, characterization, and applications of lipases**. Biotechnology advances, 2001, vol. 19, no 8, p. 627-662.

SHARIFF, Fairalniza Mohd, LEOW, Thean Chor, MUKRED, A. D., et al. **Production of L2 lipase by *Bacillus sp.* strain L2: nutritional and physical factors**. Journal of basic microbiology, 2007, vol. 47, no 5, p. 406-412.

SINHA, Shelly, CHATTOPADHYAY, Pritam, et SEN, Sukanta K. **Microbial degradation of recalcitrant PAHs-Microbial diversity involving remediation process**. In : **Microbial Degradation of Xenobiotics**. Springer, Berlin, Heide

SINGH, Abhishek Kumar et MUKHOPADHYAY, Mausumi. **Overview of fungal lipase: a review**. Applied biochemistry and biotechnology, 2012, vol. 166, no 2, p. 486-520.

SIVERIO, José M. **Assimilation of nitrate by yeasts**. FEMS microbiology reviews, 2002, vol. 26, no 3, p. 277-284.

SNELLMAN, Erick A. et COLWELL, Rita R. **Acinetobacter lipases: molecular biology, biochemical properties and biotechnological potential**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2004, vol. 31, no 9, p. 391-400.

SPIER, M. R., A. L. Woiciechowski, and C. R. Soccol. **"Produção de  $\alpha$ -Amilase por *Aspergillus* em Fermentação no Estado Sólido de Amido de Mandioca e Bagaço de Cana-de-Açúcar."** VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Anais Enzitec (2004): 116-116.

SPOHR, Anders, CARLSEN, Morten, NIELSEN, Jens, et al. **Morphological characterization of recombinant strains of *Aspergillus oryzae* producing alpha-amylase during batch cultivations**. Biotechnology letters, 1997, vol. 19, no 3, p. 257-262.

SOKOLOVSKÁ, Ivana, ALBASI, Claire, RIBA, Jean-Pierre, et al. **Production of extracellular lipase by *Candida cylindracea* CBS 6330**. Bioprocess Engineering, 1998, vol. 19, no 3, p. 179-186.

SOUZA, Paula Monteiro de, et al. **Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry-A review**. Brazilian journal of microbiology, 2010, vol. 41, no 4, p. 850-861.

SPAGNI, Alessandro, CASU, Stefania, et GRILLI, Selene. **Decolourisation of textile wastewater in a submerged anaerobic membrane bioreactor**. Bioresource technology, 2012, vol. 117, p. 180-185. SZTAJER, Helena et MALISZEWSKA, Irena. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. Biotechnology letters, 1989, vol. 11, no 12, p. 895-898.

SUÁREZ-DIEGUEZ, Teodoro, SORIANO-GARCÍA, Manuel, ANAYA-SOSA, Irasema, et al. **Comparative studies of two  $\alpha$ -amylases acting on two *Sorghum* hybrids starches (Montecillos hybrid 2 and 3) and their significant differences in their catalytic activities**. Carbohydrate polymers, 2009, vol. 75, no 3, p. 538-540.

SUNDARRAM, Ajita et MURTHY, Thirupathihalli Pandurangappa Krishna.  **$\alpha$ -amylase production and applications: a review**. Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2014, vol. 2, no 4, p. 166-175.

SUPLATOV, Dmitry, VOEVODIN, Vladimir, et ŠVEDAS, Vytas. **Robust enzyme design: Bioinformatic tools for improved protein stability**. Biotechnology journal, 2015, vol. 10, no 3, p. 344-355.

TABAK, Henry H. et COOKE, WM Bridge. **The effects of gaseous environments on the growth and metabolism of fungi**. The Botanical Review, 1968, vol. 34, no 2, p. 126-252.

TAKAÇ, Serpil et MARUL, Başak. **Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis***. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2008, vol. 35, no 9, p. 1019-1025.

TAKAMOTO, Tetsufumi, SHIRASAKA, Hitoshi, UYAMA, Hiroshi, et al. **Lipase-catalyzed hydrolytic degradation of polyurethane in organic solvent**. Chemistry Letters, 2001, vol. 30, no 6, p. 492-493.

TAN, Tianwei, ZHANG, Mu, WANG, Bingwu, et al. **Screening of high lipase producing *Candida sp.* and production of lipase by fermentation**. Process Biochemistry, 2003, vol. 39, no 4, p. 459-465.

TANIGUCHI, H. et HONNDA, Y. **Amylases**. Encyclopedia of Microbiology. 2009.

TAYLOR, Matthew J. et RICHARDSON, Tom. **Applications of microbial enzymes in food systems and in biotechnology**. In : Advances in applied microbiology. Academic Press, 1979. p. 7-35.

THIPPESWAMY, S., GIRIGOWDA, K., et MULIMANI, V. H. **Isolation and identification of  $\alpha$ -amylase producing *Bacillus sp.* from dhal industry waste**. 2006.

TOBIN, Matthew B., GUSTAFSSON, Claes, et HUISMAN, Gjal W. **Directed evolution: the 'rational' basis for 'irrational' design**. Current opinion in structural biology, 2000, vol. 10, no 4, p. 421-427.

TREICHEL, Helen, DE OLIVEIRA, Débora, MAZUTTI, Marcio A., et al. **A review on microbial lipases production**. Food and bioprocess technology, 2010, vol. 3, no 2, p. 182-196.

Haki UPGADE, Akhilesh, NANDESHWAR, Aashu, et SAMANT, Lalit. **Assessment of fungal protease enzyme from French bean using *A. niger* by Solid State Fermentation**. Journal of Microbiology and Biotechnology Research, 2011, vol. 1, p. 45-51.

UNDERKOFER, L. A., BARTON, R. R., et RENNERT, S. S. **Production of microbial enzymes and their applications**. Applied microbiology, 1958, vol. 6, no 3, p. 212.

VAKHLU, Jyoti. **Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning**. Electronic Journal of Biotechnology, 2006, vol. 9, no 1, p. 0-0.

VAN DER MAAREL, Marc JEC, VAN DER VEEN, Bart, UITDEHAAG, Joost CM, et al. **Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family**. Journal of biotechnology, 2002, vol. 94, no 2, p. 137-155.

VAN DER MERWE, MP Roux, BADENHORST, J., et BRITZ, T. J. **Fungal treatment of an edible-oil-containing industrial effluent**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, vol. 21, no 6-7, p. 947.

VAN EE, J. H., VAN RIJSWIJK, W. C., et BOLLIER, M. **Enzymatic automatic dishwasher detergents**. Chimica oggi, 1992, vol. 10, no 8-9, p. 21-24.

VAN SUIJDAM, J. C. et METZ, B. **Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds**. Biotechnology and Bioengineering, 1981, vol. 23, no 1, p. 111-148.

VENKATESHWAR, M., CHAITANYA, K., ALTAF, Md, et al. **Influence of micronutrients on yeast growth and  $\beta$ -D-fructofuranosidase production.** Indian journal of microbiology, 2010, vol. 50, no 3, p. 325-331.

WALKER, Graeme M. et WHITE, Nia A. **Introduction to fungal physiology.** Fungi: biology and applications, 2017, p. 1-35.

WIND, R. D., BUITELAAR, R. M., EGGINK, G., et al. **Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate: a highly thermostable  $\alpha$ -amylase-producing strain.** Applied Microbiology and Biotechnology, 1994, vol. 41, no 2, p. 155-162.

WU, Xiao Yan, JÄÄSKELÄINEN, Sanna, et LINKO, Yu-Yen. **An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification.** Enzyme and Microbial Technology, 1996, vol. 19, no 3, p. 226-231.

YASEEN, Dina A. et SCHOLZ, Miklas. **Shallow pond systems planted with *Lemna minor* treating azo dyes.** Ecological engineering, 2016, vol. 94, p. 295-305.

ZHANG, Yi; RUI, Xin; SIMPSON, Benjamin K. **Trends in nanozymes development versus traditional enzymes in food science.** Current Opinion in Food Science, 2020.