

Deteccão de esterase e lipase produzidas por fungos filamentosos isolados de solos da Caatinga

Detection of esterase and lipase produced by filamentous fungi isolated of Caatinga soil

DOI:10.34117/bjdv6n11-543

Recebimento dos originais: 25/10/2020

Aceitação para publicação: 25/11/2020

Eduardo da Silva França

Graduado em Ciências Biológicas

Mestrando em Desenvolvimento de Processos Ambientais pela Universidade Católica de Pernambuco Universidade Católica de Pernambuco

Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, Recife - PE, 50050-900

E-mail: eduardo.franca10@hotmail.com

Jaqueline dos Santos Marinho

Graduada em Engenharia Ambiental

Mestranda em Desenvolvimento de Processos Ambientais pela Universidade Católica de Pernambuco Universidade Católica de Pernambuco

Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, Recife - PE, 50050-900

E-mail: jaquelinemarinho@hotmail.com

Thayná Rhomana da Silva Cândido

Bacharel em Farmácia

Mestranda em Desenvolvimento de Processos Ambientais pela Universidade Católica de Pernambuco Universidade Católica de Pernambuco

Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, Recife - PE, 50050-900

E-mail: thaylp1@hotmail.com

Uiara Maria de Barros Lira Lins

Bacharel em Farmácia

Mestranda em Desenvolvimento de Processos Ambientais pela Universidade Católica de Pernambuco Universidade Católica de Pernambuco

Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, Recife - PE, 50050-900

E-mail: uiara_maria@hotmail.com

Rosileide Fontenele da Silva Andrade

Graduada em Ciências Biológicas Doutora em Ciências Biológicas

Professora Assistente II, Universidade Católica de Pernambuco

Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, 50050-900 Recife - PE

E-mail: rosileide.andrade@unicap.br

Galba Maria de Campos-Takaki

Doutora em Microbiologia e Imunologia pela UFESP Professora Titular do Curso de Engenharia Química, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco
Endereço: Rua do Príncipe, 526 – Boa Vista, 50050-590 Recife/PE.
E-mail: galba.takaki@unicap.br

Carlos Alberto Alves da Silva

Graduado em Engenharia Química Doutor em Biotecnologia
Professor Adjunto IV, Universidade Católica de Pernambuco Endereço:
Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, 50050-590 Recife – PE
E-mail: carlos.alves@unicap.br

Kaoru Okada

Doutora em Medicina
Professor Adjunto, Universidade Católica de Pernambuco (até 2017)
Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, 50050-590 Recife –
PE
E-mail: kao.okada@gmail.com

RESUMO

As esterases (E.C. 3.1.1.1) são enzimas pertencentes à classe das carboxil ester hidrolases, e atuam diretamente na clivagem e na formação de ligações ésteres, enquanto as lipases (EC 3.1.1.3) são hidrolases que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol. A utilização de enzimas nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos tão eficientes quanto os realizados pela natureza e sem impactos ambientais. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi identificar micro-organismos isoaldos da Caatinga com potencial promissor na produção das enzimas esterase e lipase. Amostras de fungos filamentosos (6 amostras) do gênero *Aspergillus* sp. denominados de SIS (10, 11, 12, 14, 92, 112) e 2 isolados de *Penicillium* sp. denominados de SIS (21, 23) foram cultivados em meios de cultura específico utilizando as temperaturas de 28°C e 35°C, durante 72 h, com acompanhamento diário. A presença do halo característico evidenciou a presença das enzimas testadas. Os melhores resultados obtidos indicaram que a produção de lipase e esterase com o *Penicillium* sp. (SIS 23), apresentando índice enzimático de 2,0cm à 35°C e á 28°C e 1,5 cm após 72 horas de cultivo destacando-se como um potencial produtor de esterase e lipase.

Palavras-chave: detecção de enzimas microbianas, fungos filamentosos, enzimas hidrolíticas

ABSTRACT

Esterases (E.C. 3.1.1.1) are enzymes belong to the class of carboxyl ester hydrolases and act directly in cleavage and formation of ester bonds, while the lipases (EC 3.1.1.3) are hydrolases that catalyze the hydrolysis of triacylglycerols to free fatty acids and glycerol). The use of enzymes in industries allows the development of technological processes as efficient as those carried out by nature and without environmental impacts. In this context, the objective this study was identify microorganisms isolated from Caatinga with promising potential in production of enzymes esterase and lipase. Samples of filamentous fungi (6 samples) *Aspergillus* sp. genus, called SIS (10, 11, 12, 14, 92, 112) and 2 isolates of *Penicillium* sp., called SIS (21, 23) were grown in specific culture means using temperatures of 28 °C and 35 °C during 72 h, with daily monitoring. The presence of the characteristic halo showed the presence of the tested enzymes. The best results obtained indicated the production of lipase and esterase by *Penicillium* sp. (SIS 23) with enzyme index of 2.0 cm at 35 °C and at 28 °C and 1.5 cm after 72 hours cultivation standing out as potential producer of esterase and lipase.

Keywords: microbial detection enzymes, filamentous fungus, hydrolytic enzymes.

1 INTRODUÇÃO

A busca por novos micro-organismos isolados e identificados de ambientes ainda pouco conhecidos como a Caatinga para produção de substâncias bioativas, principalmente as enzimas microbianas, se faz necessário pois a indústria biotecnológica necessita de novos produtores microbianos com alta eficiência de detecção em ensaios em meio sólido ou produção em fermentação submersa para futuras aplicações industriais (GORLACH-LIRA, COUTINHO, 2007; ALVES, et al., 2014; DA SILVA, et al., 2019; BARBOSA, et al., 2020).

Enzimas são quimicamente chamadas de proteínas que desempenham múltiplas funções importantes nos processos metabólicos com atividade catalítica sobre as diversas reações biológicas existentes. Possuem altos valores comerciais por apresentarem uma gama de aplicações em vários setores industriais como: de alimentos e bebidas, produtos de limpeza, produção de biocombustíveis, alimentos para animais e aplicações especiais pesquisa e biotecnologia, diagnósticos e biocatalisadores (LÓPEZ, BOND, 2008; DOS SANTOS et al., 2016; ARORA, MISHRA, MISHRA, 2020).

Podem ser produzidas por animais, plantas e micro-organismos. As de origem microbiana são preferíveis por apresentar uma série de vantagens como menor tempo de produção, alto rendimento, facilidade de manipulação e, principalmente, porque são consideradas mais ativas e estáveis que as origem animal e vegetal (NAGARAJAN, 2012; LIU E KOKARE, 2017; FERRAZ et al., 2018; TRIPATHI, YADAV, SHARMA, 2020).

A utilização de enzimas em processos industriais vêm a minimizar o impacto ambiental comparado aos métodos químicos convencionais. O uso de enzimas apresentam também como vantagens: a economia de água, energia, produtos químicos e redução do custo no tratamento de efluentes (SANTOS et al., 2016; AHMAD, et al., 2019). Dentre as enzimas empregadas para fins industriais, 75% pertencem à classe das hidrolases e, neste universo, segundo Mordor Intelligence (2020) o crescimento na produção das lipases vem sendo impulsionada pela crescente demanda de alimentos processados, aliados a crescente conscientização sobre produtos saudáveis (PANDEY et al., 1999; DENG et al.:2016; PRIJI et al.; 2019; VISHNOI, DIXIT, MISHRA, 2020).

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas denominadas de hidrolases que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol. As lipases microbianas podem ser utilizadas como aditivos em alimentos para modificar e realçar as propriedades organolépticas presentes, como também assumir a função de detergentes para hidrolisar gorduras, no tratamento de efluentes oleosos, além da presença nas industriais farmacêuticas, de cosméticos, agroquímicas e oleoquímicas. São considerados biocatalisadores versáteis que podem ser aplicados em diferentes reações químicas existentes: como hidrólise, esterificação, transesterificação e aminólise (MESSIAS et al. 2011, RIBEIRO, et al. 2011, MEHTA, BODH, GUPTA, 2017; COSTA et al. 2020, SALES et al. 2020).

Segundo a Mordor Intelligence (2020), as lipases são responsáveis por 10% da participação do mercado mundial de enzimas e esse mercado tende a crescer 8,8% até 2025. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são denominadas genericamente como esterases, diferindo das lipases por especificidade de substrato (BORNSCHEUER, 2002; AVHAD, MARCHETTI, 2019; SALES et al. 2020).

Os substratos comuns para lipases presentes nas reações são óleos e gorduras principalmente triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes. Geralmente esse grupo de enzimas não requerem a presença de cofatores, atuam em ampla faixa de pH, sendo estáveis em altas temperaturas, possuem elevadas especificidade, características desejáveis que fazem com que sejam altamente aplicáveis em processos industriais (BHARATHI, RAJALAKSHMI, 2019; THAPA et al., 2019; PATEL et al., 2019; NIYONZIMA, VEENA, SUNIL, 2020).

As esterases são enzimas que catalisam a hidrólise de um grande número de ésteres alifáticos e aromáticos e geralmente são restritas a ésteres de cadeias curtas. São amplamente distribuídas nos seres vivos. As esterases vêm sendo estudadas pelo seu potencial em diversos processos industriais como na síntese de aromas, fármacos, biopolímeros e separação de misturas racêmicas (LEHMANN et al., 2014; ZHENG et al., 2017; BOLL et al., 2020). As esterases podem ser obtidas por micro-organismos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Rhodococcus*, *Aspergillus*, *Geotrichum* (SAMESHIMA-YAMASHITA et al., 2018). Os fungos filamentosos são considerados bons produtores, pois secretam estas enzimas para o meio de cultura em níveis mais elevados que os secretados por leveduras e bactérias (KAMAT et al. 2013; GUDIUKAITE et al., 2017).

2 OBJETIVOS

Avaliar em meio sólido as amostras de fungos filamentosos isolados do solo da Caatinga de Pernambuco na determinação de lipases e esterases.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRO-ORGANISMOS

Foram utilizadas amostras de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* sp., denominados de SIS (10, 11, 12, 14, 92, 112) e *Penicillium* sp. denominados de SIS (21, 23) isolados da Caatinga de Pernambuco, previamente catalogados no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), localizado no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB). As culturas foram mantidas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), com a seguinte composição: dextrose (40g/L), peptona (10g/L), ágar (20g/L), água destilada 1000mL e pH 5,8.

3.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

O inóculo foi obtido transferindo esporos dos fungos para frascos de Erlenmeyer contendo 50mL

de água destilada estéril para obtenção de uma suspensão de 10⁷ UFC/mL. A contagem dos números de esporos em suspensão foi realizada em câmara de Neubauer e microscópio binocular. Em seguida 50µL da suspensão foram transferidas para o meio testado.

3.3 DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA

As medições dos diâmetros dos halos e das colônias foram realizadas com um paquímetro (mm), colocado no reverso das placas de Petri, durante 72 horas. A determinação enzimática foi expressa através do índice enzimático (IE), mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação, subtraindo o valor do furo e o diâmetro médio da colônia. Foi utilizado seguindo a metodologia de Hankin, Anagnostakis (1975) modificada, segundo a fórmula abaixo:

3.4 CARACTERIZAÇÃO SEMIQUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE ESTERASES

Para a detecção da atividade esterásica foi utilizada a metodologia de Sierra (1957) modificado por Mendonça et al (1996), utilizando o meio de detecção de esterase (DTE): peptona (10g/L), Cloreto de sódio (5g/L), Cloreto de cálcio dihidratado (0,1g/L), ágar (20g/L), tween 80 (10mL/L), água destilada (1000mL), pH 6.0. O tween 80 foi incorporado ao meio após ser autoclavado em vapor fluente. O meio de cultura foi distribuído em placas de Petri e após a solidificação, foram feitos furos no centro das placas, cujo diâmetro foi de 0,8 cm.

Em seguida foram inoculados 50µL da suspensão dos esporos previamente preparada. As placas foram colocadas em estufa nas temperaturas de 28°C e 35°C, durante 72 horas com acompanhamento diário. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Após o período de crescimento microbiano, as placas foram re Em seguida foram inoculados 50µL da suspensão dos esporos previamente preparada. As placas foram colocadas em estufa nas temperaturas de 28°C e 35°C, durante 72 horas com acompanhamento diário. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Após o período de crescimento microbiano, as veladas com uma solução de Iodo a 0,1N, durante 5 minutos revelando um halo opaco característico devido a precipitação do sal de cálcio, insolúvel em ácidos graxos, proveniente da catálise hidrolítica de ésteres a ácidos graxos livres.

3.5 CARACTERIZAÇÃO SEMIQUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE LIPASE

Para a detecção da atividade lipolítica foi utilizada a metodologia de Hankin, Anagnostakis (1975) modificada, utilizando o meio de detecção de lipase (DTL): peptona (10g/L), Cloreto de sódio (5g/L), Cloreto de cálcio dihidratado (0,1g/L), ágar (20g/L), tween 20 (10mL/L), água destilada (1000mL), pH 6.0. O tween 20 foi incorporado ao meio após ser autoclavado em vapor fluente.

Em seguida, após o resfriamento o tween 20 foi introduzido no meio de cultura e distribuído em placas de Petri, e seguir a sua solidificação, foram feitos furos no centro das placas, cujo diâmetro foi de 0,8 cm. Posteriormente foram inoculados 50µL da suspensão dos esporos previamente preparadas. As placas foram colocadas em estufa com temperaturas de 28°C e 35°C, durante 72 horas com acompanhamento diário.

Os ensaios foram realizados em triplicatas. Após o período de crescimento microbiano, as placas foram reveladas com uma solução de Iodo a 0,1N, durante 5 minutos revelando um halo opaco característico em torno da colônia, resultado da precipitação do sal de cálcio, que é insolúvel em ácidos graxos, proveniente catálise hidrolítica do triacilglicerol em ácidos graxos livres e glicerol.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises das atividades enzimáticas esterásicas e lipolíticas descritos nas Figuras 1-4, indicam que os micro-organismos testados apresentaram uma ampla variação quanto ao potencial de produção das enzimas em relação às temperaturas testadas. Conforme descrito em literatura, até 38°C é possível obter-se uma maior produção enzimática por fungos de diversos gêneros e espécies (BHARATHI, RAJALAKSHMI, 2019).

As amostras que se destacaram nas atividades enzimáticas esterásicas e lipásicas foram do gênero *Penicillium* descritos nas Figuras 1-4. Na produção de esterase as amostras de *Penicillium* sp. (SIS 21 e SIS 23) se destacaram (Figuras 2), apresentando índices enzimáticos de 2,0 cm, na temperatura de 35°C e a temperatura de 28°C 1,4 cm, após período de 72 horas de cultivo.

Figura 1. Atividade esterásica dos isolados de *Aspergillus* sp. (SIS 10, 14, 92) durante 72 horas de cultivo nas temperaturas de 28°C e 35°C

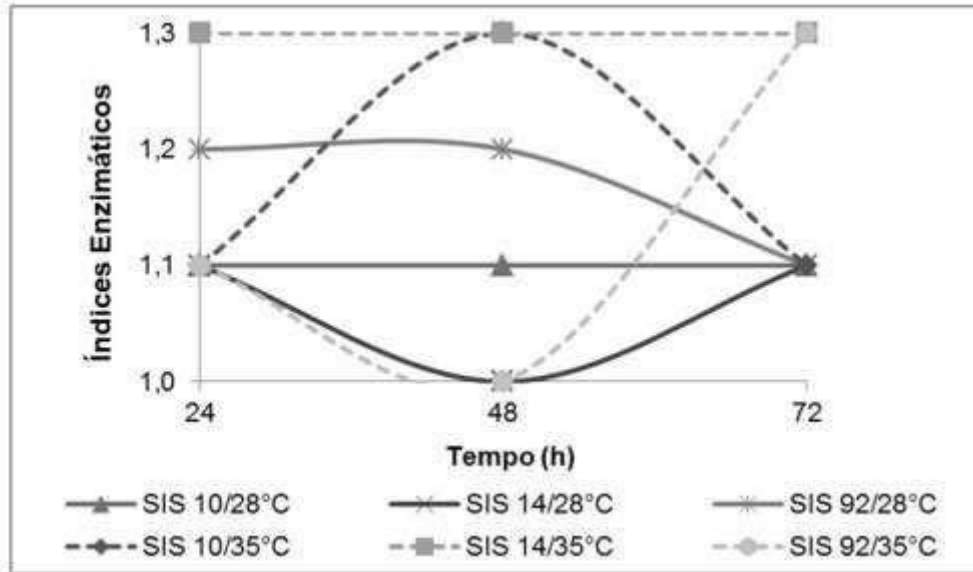
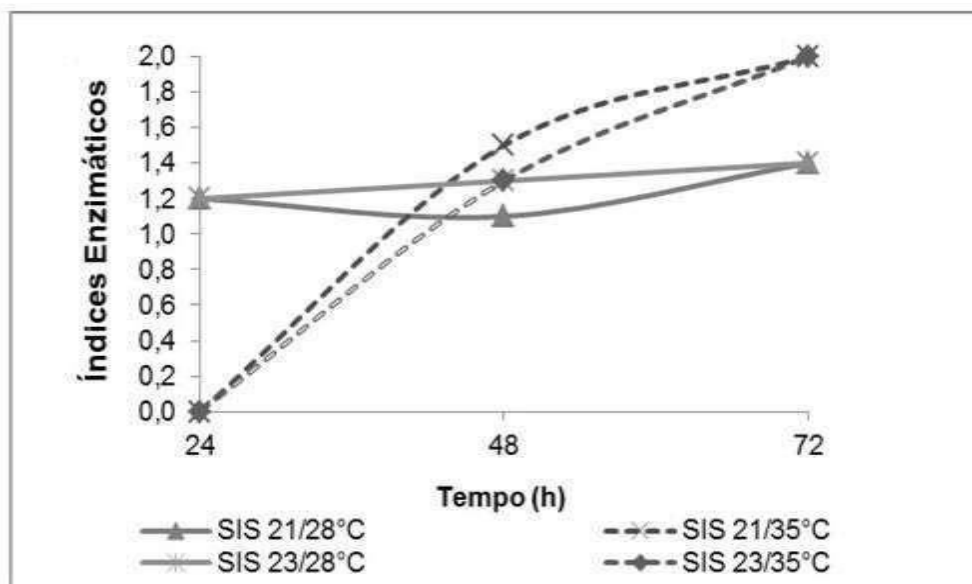


Figura 2. Atividade esterásica dos isolados de *Penicillium* sp. (21, 23) durante 72 horas de cultivo em temperatura de 28°C e 35°C

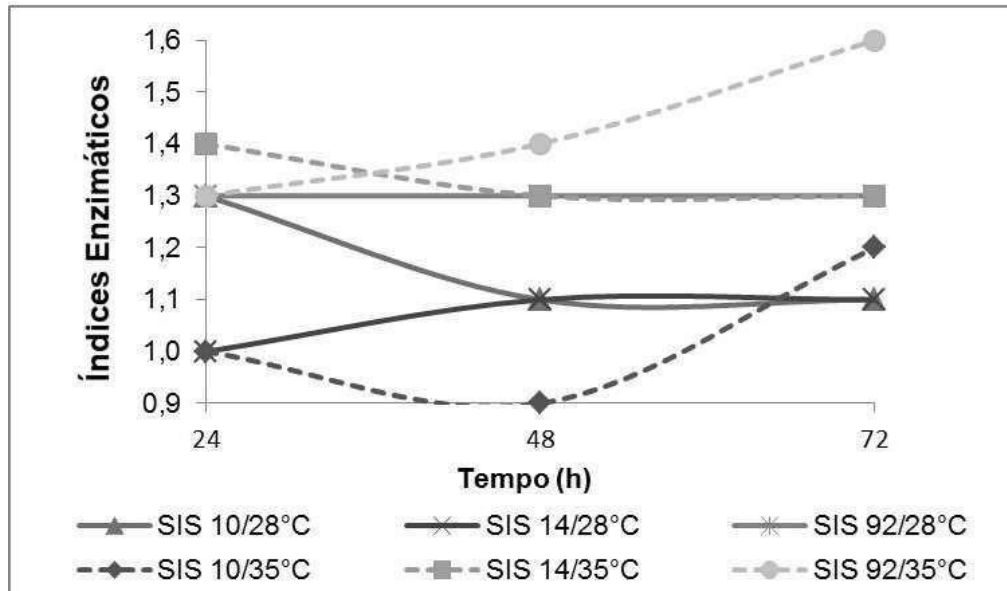


Na detecção de lipase, a amostra que se destacou foi *Penicillium* sp. (SIS 23) descrito na Figura 4, que apresentou um índice enzimático de 2,0 cm à 35°C e a 28°C de 1,5 cm após 72 horas de cultivo, se destacando como um potencial produtor de lipase e esterase em relação às demais amostras testadas (Figura 5).

Rodrigues et al (2016) utilizando linhagens de *Penicillium* sp. e Lima et al (2014), utilizando linhagens de *Aspergillus* sp. descreveram que resultados $\geq 2,0$ cm são considerados bons valores na detecção de enzimas produzidas por micro-organismos. Carvalho et al (2013) destacaram resultados

satisfatórios na produção de esterase utilizando amostras de leveduras, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

Figura 3. Atividade lipolítica dos isolados de *Aspergillus* sp. (SIS 10, 14, 92) durante 72 horas de crescimento em 28°C e 35°C.



As amostras de *Penicillium* sp. (SIS 21) e o *Aspergillus* sp. (SIS 92) descritos na Figura 4, demonstraram que após 72 horas de cultivo á 35°C, apresentaram índices enzimáticos entre 1,7 e 1,6 cm. Soares et al (1999) também descreveram que, utilizando linhagens de *Aspergillus* sp., obtiveram valores enzimáticos <2,0, relatando que esses valores indicam um baixo potencial enzimático, considerando que um micro-organismo bom produtor de enzimas extracelulares é classificado com índice enzimático $\geq 2,0$. Apesar de não atingirem o índice enzimático recomendado, podem ser considerados potencial de produtores intermediários de lipase, pois atingiram índices enzimáticos próximos a 2,0 cm. Enquanto os demais se agrupam em uma produção enzimática inferior.

As amostras SIS (11, 12, 112) do gênero *Aspergillus* não foram detectadas produção nas enzimas testadas, pois apresentaram índices abaixo dos valores descritos na literatura.

Figura 4. Atividade lipolítica dos isolados de *Penicillium* sp. (21, 23) durante 72 horas de cultivo na temperatura de 28°C e 35°C.

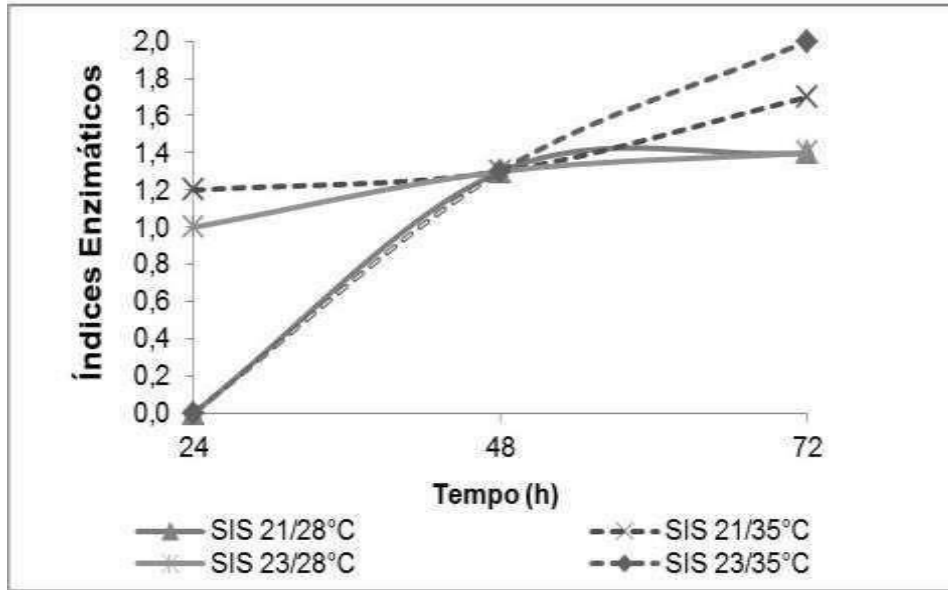
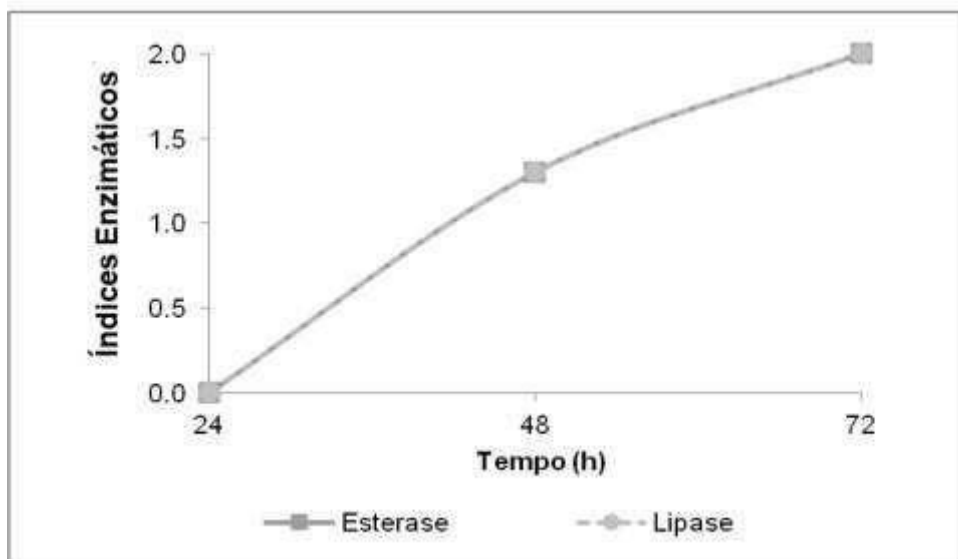


Figura 5. Resultados das atividades enzimáticas esterásicas e lipásicas do *Penicillium* sp. (SIS 23) na temperatura de 35°C nas 72 horas de cultivo



Em estudos realizados por Costa et al (2017), que utilizaram resíduos agroindustriais como substrato em fermentação sólida, obtiveram a sua máxima produção de lipase a partir de amostras de *Aspergillus niger* em meio contendo farelo de arroz suplementado com glicerol como fonte de carbono. Também foi observada uma atividade enzimática intermediária através de farelo de trigo ou uma mistura deste ao farelo de arroz.

A adição do glicerol torna esta amostra mais eficiente na produção desta enzima, devido a capacidade da substância em liberar mais facilmente as moléculas de ácidos graxos, aumentando assim a sua eficiência enzimática (FENG; HUANG; PENG, 2019). A maior atividade de *Aspergillus niger*

também foi observada em 48 horas nos ensaios realizados por Indah, Mappiratu e Musafira (2017), onde verifica-se o aumento do crescimento do micro-organismo e o início da fase estacionária.

Outros autores que também conseguiram obter a enzima hidrolítica a partir da mesma amostra de forma satisfatória utilizaram resíduos agroindustriais em seu meio de produção. O uso de resíduos contribui para a biossíntese de baixo custo, pois são rejeitos da extensa produção agrícola de países em desenvolvimento e o seu descarte é também um problema ambiental, e contribuem principalmente no fornecimento de nutrientes necessários para o crescimento das células microbianas (NEMA, PATNALA, MANDARI et al, 2019; TACIN, MASSI, FUNGARO et al, 2019; PRABANINGTYAS, PUTRI, UTAMI et al, 2018).

Kumar, Rani, Gunaseeli et al (2017) utilizaram em seus estudos a fermentação sólida e submersa para produção da lipase pelo *Aspergillus japonicus* MF-1: óleo de amendoim associado a agentes redutores e oxidantes na fermentação sólida, que obteve o máximo de produção da enzima (266 U/g), enquanto que em fermentação submersa na presença de óleo medicinal sendo produzido cerca de 58% deste valor.

Um dos fatores importantes para a otimização da produção enzimática por fungos é o tipo de fermentação. A fermentação sólida é bastante utilizada por apresentar maior produtividade em relação a forma submersa além de apresentar menor gasto energético, baixo índice de contaminação devido a ausência de água, utilizar equipamentos simples e de baixo custo e por facilitar a implementação dos rejeitos industriais, principalmente óleos, em seu meio de produção (MEHTA, BODH, GUPTA, 2017; UTAMI, HARIYANE, ALAMSYAH et al, 2017; NIYONZIMA, VEENA, MORE, 2020). A constituição do meio de produção é outro fator a ser observado, já que sua formulação é determinante para o sucesso do do ensaio. A relação Carbono (C) e Nitrogênio (N) precisam ser adequadas para atender as necessidades específicas dos microrganismos estudados e conforme afirma Costa et al (2017), a quantidade de Nitrogênio (N) tem grande influência na produção de lipase, seja ele orgânico ou inorgânico, podendo a concentração empregada auxiliar apenas no crescimento de biomassa e não enzimático.

Outras amostras que apresentaram produção satisfatória de lipase otimizando-se o meio produtivo foram *Aspergillus terreus* (DE AZEVEDO; OLIVEIRA E ALCÂNTARA et al, 2020), *Aspergillus fumigatus* (OLIVEIRA; FRENCH e MARQUES et al, 2020; MEHTA; GROVER e GRUPTA, 2018),

Aspergillus oryzae (PAITAI; H-KITTIKUN, 2019) e *Aspergillus ibericus* (OLIVEIRA, SOUZA e PECLAT et al, 2017).

O gênero *Penicillium* agrupa boa parte dos fungos que são bons produtores de lipase e diversas enzimas extracelulares com boas aplicações biotecnológicas, podendo suas amostras se desenvolverem em diversos ambientes como na manta superficial de florestas, decompondo folhas e frutos.

Isolando espécies deste local para investigar o seu potencial lipolítico, Ortellado e Lisowiec et al (2020) obtiveram bons resultados em sete das amostras em fermentação submersa suplementada com 2% de azeite de oliva a partir do sexto dia, a 30°C, dentro da faixa de temperatura empregada descrita e neste estudo.

Também na mesma faixa de temperatura e trabalhando com fermentação sólida, Abdullah e Kaiser et al (2018) conseguiram extrair lipase de uma amostra de *Penicillium* sp. Ao testarem outras faixas de temperatura, verificaram que 10°C abaixo e acima de 30°C, a produção das enzimas diminuiu, pois mesmo aumentando o metabolismo e crescimento microbiano, a formação de enzimas foi reduzida. Já a amostra de *Penicillium camemberti* produziu também protease. Neste estudo conduzido por Boratynski e Szczepanska et al (2018), o fungo produziu a lipase em 48 horas, mais rápido que em nosso estudo, e a protease em 120 horas. Acredita-se que os lipídeos foram consumidos primeiro para que depois as proteínas, como fontes tardias de energia, fossem metabolizadas.

Alguns estudos pesquisaram também a termoestabilidade da enzima microbiana. A lipase produzida por *Penicillium* sp. foi capaz de permanecer termoestável até 40°C por meia hora (FERREIRA, RIBEIRO, SANTANA et al, 2017) enquanto que a hidrolase produzida por *Penicillium roqueforti* manteve sua máxima atividade enzimática por 50 minutos a 50°C (SILVA, SOUZA, REIS et al, 2019), respectivamente numa faixa de pH 7,0 e 6,8. De acordo com Turati e Almeida et al (2019), a estabilidade de enzimas extremófilas em temperatura e pH fora da faixa tida como ideal para atividade enzimática em geral é importante para a diversa produção industrial.

5 CONCLUSÃO

Os resultados evidenciam um elevado potencial biotecnológico na produção de esterase e lipase pelo gênero *Penicillium* sp., destacando-se a amostra denominada de *Penicillium* sp. (SIS 23) que apresentou bom índice enzimático, assim colocando-o como um potencial produtor das enzimas estudadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da FACEPE (APQ.0291-2.12/15), da CAPES e do CNPq (Processo No. 314422/2018-8).

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, R.; QAISER, H.; IFTIKHAR, T., et al. Application of response surface methodology for statistical optimization of lipase production by *Penicillium* sp. employing solid state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 17, n. 3, p. 863-875, 2018. Text disponível em <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n3/Abdulla>
- ALVES, A. M., MOURA, R. B. de, CARVALHO, A. K. F., et al. *Penicillium citrinum* whole-cells catalyst for the treatment of lipid-rich wastewater. *Biomass and Bioenergy*, v. 120, p. 433-438, 2019.
- AHMAD, T.; AADILA, R.M.; AHMEDA, H., RAHMANA, U.U.; SOARES, B.C.V.; SOUZA, S.L.Q.; SCUDINOD, H.; PIMENTELC, T.C.; GUIMARÃES, J.T.; ESMERINO, E.A.; FREITAS, M.Q.; ALMADA, R.B.; VENDRAMEL, S.M.R.; SILVA, M.C.; CRUZ, A.G. Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review *Trends in Food Science & Technology*, v. 88, p. 361-372, 2019.
- ALVES, P. D. D.; SIQUEIRA, F.F.; FACCHIN, S.; HORTA, C.C.R.; VICTORIA, J.M.N.; KALAPOTHAKIS, E. Survey of microbial enzymes in soil, water, and plant microenvironments. *The Open Microbiology Journal*, v. 8, p. 25, 2014.
- ARORA, N. K.; MISHRA, J.; MISHRA, V. Microbial enzymes: roles and applications in industries, p. 1-110, 2020.
- AVHAD, M. R.; MARCHETTI, J. Uses of enzymes for biodiesel production. In: *Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts*. Woodhead Publishing, p. 135-152, 2019.
- BARBOSA, R. N.; BEZERRA, J. D.P.; SANTOS, A.C.S.; MELO, R.F.R.; HOUBRAKEN; OLIVEIRA, N.T. SOUZA-MOTTA, C.M. Brazilian tropical dry forest (Caatinga) in the spotlight: an overview of species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* (Eurotiales) and the description of *P. vascosobrinhus* sp. nov. *Acta Botanica Brasilica*, v. 34, n.; SOUZA-MOTTA. 2, p. 409-429, 2020.
- BHARATHI, D., RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 22, p. 101368, 2019.
- BOLL, M.; GEIGER, R.; JUNGHARE, M.; SCHINK, B. Microbial degradation of phthalates: biochemistry and environmental implications. *Environmental microbiology reports*, v. 12, n. 1, p. 3-15, 2020.
- COSTA, T. P., SPENCER, P. V., SOUZA, M. J., ROCHA, A. C., NELSON, D. L., PINTO, N. A., & BENASSI, V.
- M. Standardization of the cultivation of the isolated filamentous fungus A4 for lipase production. *Brazilian Journal of Development*, 6(10), 76404-76423, 2020.

DA SILVA, I. L.; DA SILVA, L. A. O.; COELHO, L. C. B. B. The Brazilian Caatinga Biome and Its Biotechnological Potential. v.5, p.123-141, 2019.

DE AZEVEDO, W. M., DE OLIVEIRA, L. F. R., ALCÂNTARA, M. A., et al. Turning cacay butter and wheat bran into substrate for lipase production by *Aspergillus terreus* NRRL-255. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, v. 50, ed. 7, p. 689-696, 2020.

DENG, D.; ZHANG, Y.; SUN, A.; LIANG, J.; HU, Y. Functional characterization of a novel marine microbial GDSL lipase and its utilization in the resolution of (\pm)-1-phenylethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 179, n. 1, p. 75-93, 2016.

DOS SANTOS, A. F. et al. *Peptidases em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. Biotecnologia Aplicada à Agro & Indústria: Fundamentos e Aplicações*. São Paulo: Editora Blücher, v. 1, Cap. 7, 1 ed., 2016.

BORATYŃSKI, F., SZCZEPAŃSKA, E., GRUDNIEWSKA, A., et al. Improving of hydrolases biosynthesis by solid-state fermentation of *Penicillium camemberti* on rapeseed cake. *Scientific Reports*, v. 8, ed. 1, p. 10157, 2018.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS microbiology reviews*, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2002.

CARVALHO, P. et al. Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: study of the enzymatic activities. *African Journal of Microbiology Research*, v. 7, n. 32, p. 4176-4190, 2013.

COSTA, T. N., HERMANN, K. L., GARCIA-ROMAN, M., et al. Lipase production by *Aspergillus niger* grown in different agro-industrial wastes by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.34, ed. 2, p. 419-427, 2017.

FENG, K. HUANG, Z., PENG, B., et al. Immobilization of *Aspergillus niger* lipase onto a novel macroporous acrylic resin: Stable and recyclable biocatalysis for deacidification of high-acid soy sauce residue oil. *Bioresource Technology*, v. 298, p. 122553, 2020.

FERRAZ, J. L. de A. A. et al. Obtenção de Lipases Microbianas: Uma Breve Revisão. *RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 20, n. 1, p. 30-54, 2018.

FERREIRA, A. N., RIBEIRO, D. dos S., SANTANA, R. A., et al. Production of lipase from *Penicillium* sp. using waste oils and *Nopalea cochenillifera*. *Chemical Engineering Communications*, v. 204, ed. 10, p. 1167-1173, 2017.

GUDIUKAITE, R. et al. Construction of a novel lipolytic fusion biocatalyst GDEst-lip for industrial application. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 44, n. 6, p. 799–815, 2017.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKI, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*, v.67, p.597 – 607, 1975.

INDAH, I., MAPPIRATU, M., MUSAFIRA, M. Lipase Production from *Aspergillus niger* of Copra Mold Isolates Using Grated Coconut Medium. *Kovalen Jurnal Riset Kimia*, v. 3, ed. 3, p. 269-276, 2017. Texto disponível em < <https://bestjournal.untad.ac.id/index.php/kovalen/article/view/9335>>.

KAMAT, S. et al. Produção acoplada de óleo unicelular como matéria-prima de biodiesel, xilitol e xilanase a partir do bagaço de cana-de-açúcar em um conceito de biorrefinaria utilizando fungos de manguezais tropicais. *Tecnologia Bioresource*, v. 135, p. 246-253, 2013.

KUMAR, N. V., RANI, M. E., GUNASEELI, R. R. et al. Lipase Production using *Aspergillus japonicus* MF-1 through Biotransformation of Agro-Waste and Medicinal Oil Effluent. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 6, ed. 4, p. 2005-2020, 2017.

K.; COUTINHO, H. D. M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, n. 38, p. 135– 141, 2007.

LEHMANN, S. C. et al. Characterization of a Novel *Pseudomonas stutzeri* Lipase / Esterase with Potential Application in the Production of Chiral Secondary Alcohols. *Advances in Bioscience and Biothechnology*, v. 13, n. November, p. 1009–1017, 2014.

LIPASE MARKET - Growth, Trends and Forecasts (2020- 2025).
Disponível em:

<<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/lipase-market>>. Acesso em 22 de setembro de 2020.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. p. 267–298, 2017.

LÓPEZ-OTÍN C., BOND J. S., Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 283, p. 30433-30437, 2008.

MEHTA, A., BODH, U., GUPTA, R. Fungal lipases: A review. *Journal of Biotech Research*, v. 8, p. 58-77, 2017. Texto disponível em < <http://www.btsjournals.com/assets/2017v8p58-77.pdf> >

MEHTA, A., BODH, U., GUPTA, R. Isolation of a novel lipase producing fungal isolate *Aspergillus fumigatus* and production optimization of enzyme. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 36, ed. 6, p. 450-457, 2018.

MENDONÇA, A. L. MARIANO, R. L. R.; ARAUJO, J. M.; et al. *Bacillus* sp. produtores de proteases: Isolamento, caracterização e melhoramento de *B. Cereus* (C124). *Arq. Biol. Tecnol. Curitiba*, v.39, p. 359-372, 1996.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina. Ciências Exatas e Tecnológicas*, p. 213-234, 2011.

NAGARAJAN, S. New tools for exploring old friends-microbial lipases. *Appl Biochem Biotechnol*, 168: 1163– 1196, 2012.

NEMA, A., PATNALA, S. H., MANDARI, V., et al. Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. *Bulletin of the National Research Centre*, v. 43, ed. 1, p. 82, 2019.

NYONZIMA, F. N.; VEENA, S. M.; MORE, S. S. Industrial Production and Optimization Of Microbial Enzymes. In: *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries*. Springer, Singapore, p. 115-135, 2020.

OLIVEIRA, A. C. D., FRENSCH, G., MARQUES, F de A., et al. Production of methyl oleate by direct addition of ibericus from oil cakes and its application in esterification reactions. *Food and Bioproducts Processing*, v. 102, p. 268-277, 2017.

ORTELLADO, L. E., LISOWIEC, L. A., QUIROGA-ZINGARETTI, A. E., et al. Exploring novel *Penicillium* lipolytic activity from Paranaense rainforest. *Environmental Technology*, p. 1-9, 2020.

PAITAI, P., H-KITTIKIN, A., Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates of *Aspergillus oryzae* ST11 Lipase Using Polyacrylonitrile Coated Magnetic Nanoparticles for Biodiesel Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 190, ed. 4, p. 1319-1332, 2020.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V.T. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and applied biochemistry*, v. 29, n. 2, p. 119-131, 1999.

PRABANINGTYAS, R.K., PUTRI, D. N., UTAMI, T. S., et al. Production of immobilized extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method using palm kernel cake, soybean meal, and coir pith as the substrate. *Energy Procedia*, v. 153, p. 242-247, 2018.

RIBEIRO, B. D. et al. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Research*, v. 2011, 2011.

RODRIGUES, C. et al. Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases com base na atividade lipásica e no potencial hidrolítico sobre óleo comestível de soja e escuma de caixa de gordura. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 21, n. 3, p. 507-518, 2016.

SAMESHIMA-YAMASHITA, Y. et al. Pretreatment with an esterase from the yeast *Pseudozyma antarctica* accelerates biodegradation of plastic mulch film in soil under laboratory conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. xx, n. xx, p. 6–11, 2018.

SALES, J. C. S. et al. Supplementation of watermelon peels as an enhancer of lipase and esterase production by *Yarrowia lipolytica* in solid-state fermentation and their potential use as biocatalysts in poly (ethylene terephthalate)(PET) depolymerization reactions. *Biocatalysis and Biotransformation*, p. 1-12, 2020.

SIERRA, G. A. Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antoine Van Leeuwenhoek*. Amsterdam, v.23, p.15-22, 1957.

SILVA, T., SOUZA, L., REIS, N., et al. Cultivation of *Penicillium roqueforti* in cocoa shell to produce and characterize its lipase extract. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, v.16. n.3, p. 745-756. 2019. Texto disponível em < <http://rmiq.org/ojs311/index.php/rmiq/article/view/731>>

SOARES, C. M. F. et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore sílica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.79, n.77, p.745-757, 1999.

TACIN, M. V., MASSI, F. P., FUNGARO, M. H. P., et al. Biotechnological valorization of oils from agro- industrial wastes to produce lipase using *Aspergillus* sp. from Amazon. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 17, p. 369-378, 2019.

THAPA, S. et al. Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular biotechnology*, p. 1-23, 2019.

TRIPATHI, B. C.; YADAV, P.; SHARMA, R. Microbial Enzymes in Food Industry: Applications. *Journal of Critical Reviews*, v. 7, n. 9, p. 1418-1422, 2020.

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

VISHNOI, N.; DIXIT, S.; MISHRA, J. Microbial Lipases and Their Versatile Applications. In: *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries*. Springer, Singapore, p. 207-230, 2020.

UTAMI, T. S., HARIYANI, I., ALAMSYAH, G., et al. Production of dry extract extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method to catalyze biodiesel synthesis. *Energy Procedia*, v. 136, p. 41-46, 2017.

ZHENG, J. et al. Protein Expression and Purification A stereoselective esterase from *Bacillus megaterium* : Purification, gene cloning , expression and catalytic properties. *Protein Expression and Purification*, v. 136, p. 66–72, 2017.