

Otimização da produção de enzimas lipases a partir de *Aspergillus niger* por fermentação submersa usando Óleo de Fritura Residual (OFR)

Optimization of lipase enzyme production from *Aspergillus niger* by submerged fermentation using Residual Frying Oil (RFO)

DOI:10.34117/bjdv9n2-053

Recebimento dos originais: 02/01/2023

Aceitação para publicação: 08/02/2023

Claudio Junior dos Santos

Mestrando em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal de Sergipe - Campus São Cristóvão

Endereço: Avenida Marechal Rondon Jardim s/n, Rosa Elze, São Cristóvão - SE,
CEP: 49100-000

E-mail: claudiojr.santos@outlook.com

Keilla Santos Cerqueira

Mestre em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal da Bahia - Campus Federação

Endereço: Rua Professor Aristides Novis, Federação, Salvador – BA, CEP: 40210-630
E-mail: keillascerqueira@hotmail.com

Jacqueline Rêgo da Silva Rodrigues

Doutora em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal de Sergipe - Campus São Cristóvão

Endereço: Avenida Marechal Rondon Jardim s/n, Rosa Elze, São Cristóvão - SE,
CEP: 49100-000

E-mail: jrodrigues@ufs.br

Roberto Rodrigues de Souza

Doutor em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal de Sergipe - Campus São Cristóvão

Endereço: Avenida Marechal Rondon Jardim s/n, Rosa Elze, São Cristóvão - SE,
CEP: 49100-000

E-mail: rrsouza.br@gmail.com

RESUMO

As lipases são enzimas que têm um papel importante na indústria pela sua ampla utilização, dando origem a um grande interesse em bioprocessos industriais devido à sua versatilidade. Com o avanço das pesquisas, mais espécies de lipases com propriedades específicas estão sendo investigadas. Estas enzimas podem ser produzidas a partir de uma diversidade de espécies microbiológicas. Dentre os microrganismos produtores de lipase, está o *Aspergillus niger* que tem atraído grande interesse na área da biotecnologia devido à sua facilidade de produção, produção essa que pode ser feita através do uso de óleos de residuais como fonte de carbono. Pensando nisso, a obtenção de enzimas lipases utilizando este resíduo é uma forma de agregar valor a um subproduto que muitas vezes é eliminado nas redes de esgotos sanitários prejudicando e encarecendo o sistema de

tratamento. Este trabalho consiste em avaliar a produção de lipases utilizando várias concentrações de óleo de fritura residual (OFR) e diferentes pHs, através das análises ANOVA. A produção das enzimas lipásicas foi favorecida a pH 2, com uma concentração de óleo de 1.5% (v/v) durante um período de 24 horas resultando em uma atividade enzimática de 141.90 U/mL. Os teste de estabilidade constataram que extrato enzimático produzido permaneceu estável após 28 dias em temperaturas de 15°C a 37°C, apontando melhor resultado de atividade em 15°C.

Palavras-chave: lipases, Óleo de Fritura Residual (OFR), produção enzimática.

ABSTRACT

Lipases are enzymes have an important role in industry due to their wide use, giving rise to a great interest in industrial bioprocesses because of their versatility. As research advances, more species of lipases with specific properties are being investigated. These enzymes can be produced from a diversity of microbiological species. Among the lipase-producing microorganisms is *Aspergillus niger*, which has attracted great interest in biotechnology because of its ease of production, which can be done by using waste oils as a carbon source. With this in mind, obtaining lipase enzymes using this residue is a way to add value to a byproduct that is often disposed of in the sewage system, which harms and makes the treatment system more expensive. This work consists in evaluating the production of lipases using various concentrations of residual frying oil (RFO) and different pHs, through ANOVA analysis. The production of lipase enzymes was favored at pH 2, with an oil concentration of 1.5% (v/v) during a period of 24 hours resulting in an enzyme activity of 141.90 U/mL. Stability tests found that the enzyme extract produced remained stable after 28 days at temperatures from 15°C to 37°C, with the best activity results at 15°C.

Keywords: lipases, Frying Oil Waste (OFR), enzymatic production.

1 INTRODUÇÃO

Ultimamente, as enzimas têm sido utilizadas em diversas aplicações industriais devido as suas características, entre elas, uma alta conversão catalítica, especificidade, e por acelerar reações químicas sem a formação de contaminantes ou produtos indesejados (HECK, 2021; LIMA *et al.*, 2019). Com essas vantagens, tornaram-se frequente o uso de enzimas como biocatalisadores em diversos setores industriais (HARES JUNIOR, 2017).

Um grupo de enzimas bastante estudadas são chamadas lipases, este nome é o termo genérico usado para classificar este grupo pertencente à classe das hidrolases e que atuam sobre ligações éster (HARES JUNIOR, 2017; OLIVEIRA, 2020). Estas enzimas podem ser denominadas de triacilglicerol acilidrolase, termo recomendado por *Enzyme Commission of the IUBMB* que apresenta nome de classificação E.C. 3.1.1.3 (COSTA *et al.*, 2020; HECK, 2021; RIGO *et al.*, 2021).

Tipicamente, as lipases catalisam a hidrólise de éster em meio aquoso. Estas reações de hidrólise ocorrem de forma sequencial dos grupos acila no glicerídeo, resultando em uma mistura reacional que além de apresentarem triglicerídeo, água, glicerol e ácidos graxos, também contém monoacilgliceróis e diacilgliceróis (OLIVEIRA, 2020; HECK, 2021).

Há diversas vantagens da utilização de lipases na indústria, como a presença de estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, a facilidade de separação de produtos. Também, apresentam facilidade de separação por processos de filtração e centrifugação (HECK, 2021). Além disso, por apresentar natureza biodegradável e não tóxica, alta eficiência catalítica e não necessitarem de um cofator (OLIVEIRA, 2020).

Para a produção industrial de enzimas microbianas, são considerados muitos fatores, como seleção de microrganismos que apresentem crescimento considerável em substratos de baixo custo (OLIVEIRA, 2020), capacidade de produção enzimática a uma velocidade alta, constante e com menor tempo (FRANÇA, 2021) e optar por métodos de recuperação simples bem como extrato enzimático estável (HECK, 2021). O resultado satisfatório para esta produção depende do grau em que é alcançada a atividade dos microrganismos, custos do substrato, período de incubação e recuperação enzimática (FRANÇA, 2021).

A produção desta enzima em escala industrial utiliza o bioprocessamento submerso podendo ser em batelada ou batelada alimentada. Neste processo, muitos fungos filamentosos dos mais variados gêneros são usados para produção de lipases, dentre eles temos, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium* (RIGO *et al.*, 2021). O presente trabalho visa a otimização da produção de enzimas lipases a partir de *Aspergillus niger* por fermentação submersa usando óleo de fritura residual (OFR).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O óleo de soja residual de fritura (OFR) utilizado nesta pesquisa foi adquirido em pastelaria na feira do Conjunto Eduardo Gomes da Cidade de São Cristóvão-SE (10.928 ° S, 37.119 ° W). Todo trabalho foi desenvolvido no laboratório de biotecnologia e meio ambiente (LABAM) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) (10.923 ° S, 37.099 ° W). O *Aspergillus niger* foi obtido no LABAM, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Brasil. Estes microrganismos foram isolados no meio ágar batata dextrose (PDA) em tubos inclinados.

2.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Em erlenmeyer foi adicionado 200 mL de inóculo e mantido em agitador orbital shaker a 30°C e agitação constante de 250 rpm por 24 horas. A composição do meio do inóculo para a espécie fúngica (*Aspergillus niger*) isolada, 2% (m/v) de caseína e peptona, 0,1% (m/v) de extrato de levedura, 0,05 % (m/v) de $MgSO_4$ e $NaNO_3$; 1% (v/v) de óleo de fritura para todos os experimentos. Este procedimento foi adaptado da metodologia sugerida por CASTRO *et al.* (2016).

2.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS LIPASES

Em erlenmeyer foi adicionado 200 mL de inóculo e mantido em agitador orbital shaker a 30°C e agitação constante de 250 rpm por 24 horas. A composição do meio do inóculo para a espécie fúngica (*Aspergillus niger*) isolada, 2% (m/v) de caseína e peptona, 0,1% (m/v) de extrato de levedura, 0,05 % (m/v) de $MgSO_4$ e $NaNO_3$; 1% (v/v) de óleo de fritura para todos os experimentos. Este procedimento foi adaptado da metodologia sugerida por CASTRO *et al.* (2016).

A fim de determinar a melhor condição para a produção das lipases, foi realizado um planejamento experimental adaptando a metodologia utilizada por CASTRO *et al.* (2016). A metodologia de superfície de resposta para otimizar a produção desta enzima considerou três variáveis independentes: a concentração do óleo de fritura (% m/v), pH e tempo (h) (TABELA 1). Doze experimentos foram projetados para os três níveis e três fatores (-1, 0, +1) usando design composto central (DCC) com o Software Statistica 12.0. As variáveis do desenho experimental e a matriz do planejamento fatorial são apresentadas, respectivamente, na Tabela 1 e 2. Todos os resultados do experimento foram usados na análise ANOVA.

Tabela 1 - Níveis do planejamento experimental da produção da lipase.

Variáveis independentes	Níveis codificados das variáveis independentes		
	-1	0	+1
Tempo (h)	24	48	72
pH	2	5	8
Conc. do óleo (% v/v)	0,5	1,0	1,5

Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental fatorial composto central 2³.

Ensaio	pH	Conc. óleo (% v/v)	Tempo (h)
1	2	0,5	24
2	2	0,5	72
3	8	0,5	24
4	8	0,5	72
5	2	1,5	24
6	2	1,5	72
7	8	1,5	24
8	8	1,5	72
9	5	1,0	48
10	5	1,0	48
11	5	1,0	48
12	5	1,0	48

Na produção da lipase foram utilizados uma suspensão de esporos de 10⁷ esporos/mL em cada erlenmeyer, calculado após contagem dos esporos em câmara de Neubauer após 24 horas de reação. A etapa de produção das lipases foi realizada conforme o planejamento experimental, mantendo o meio reacional em agitador orbital shaker, velocidade de agitação de 300 rpm a 30°C. Foram preparados 2400 mL do meio otimizado e este dividido em 12 erlenmeyers. O extrato bruto enzimático foi separado por meio de centrifugação a 3400 rpm por 15 minutos.

2.3 ANÁLISES DO MONITORAMENTO

2.3.1 Determinação da Atividade Lipásica

A determinação da atividade lipásica foi realizada pelo método titulométrico usando solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 M e fenolftaleína como indicador (FARIAS *et al.*, 2015). Neste procedimento, o óleo de fritura residual com concentração de 10 % (m/v) foi emulsionado com goma arábica na concentração de 0,05 g/ mL (5%) em 100 mL de água destilada. Em cada erlenmeyer contendo 5 mL desta emulsão foram adicionados 1 mL do extrato enzimático bruto, seguidos de incubação por 1 hora a 37°C em banho maria. Todos os experimentos foram realizados em triplicata a fim de obter atividade lipásica para este tipo de substrato. A atividade desta enzima, foi calculada seguindo a Equação 1:

$$AL = \frac{V_1 \cdot M \cdot f_c \cdot 1000}{V_2} \quad (\text{Equação 1})$$

AL = Atividade lipásica (U/mL);
V1 = Volume da amostra titulada;
M = Molaridade da solução de NaOH;

fc = Fator de correção do NaOH;
V2 = Extrato enzimático;

2.3.2 Estabilidade Enzimática

O extrato enzimático foi testado nas temperaturas de 15°C a 37°C por um período de 24 a 72 horas e após 28 dias mantendo uma temperatura de 15°C e refrigeração (4°C) para avaliar a estabilidade e conservação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES

Após a realização dos ensaios do planejamento experimental com três variáveis independentes, foram obtidos os resultados descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados do planejamento experimental fatorial composto central 2³.

Ensaios	pH	Conc. óleo (% v/v)	Tempo (h)	Atividade Lipásica (U/mL)
1	2	0,5	24	130,43
2	2	0,5	72	124,70
3	8	0,5	24	28,67
4	8	0,5	72	22,93
5	2	1,5	24	141,90
6	2	1,5	72	139,03
7	8	1,5	24	34,40
8	8	1,5	72	11,47
9	5	1,0	48	35,83
10	5	1,0	48	38,70
11	5	1,0	48	37,27
12	5	1,0	48	40,13

Nas condições estudadas, os valores de atividade enzimática variaram de 11,47 U/mL a 141,90 U/mL. Como visto na Tabela 3, o maior resultado obtido para a atividade lipásica (U/mL) foi para o ensaio 5 (141,90 U/mL), com pH 2, concentração do óleo de 1,5 % v/v por 24 horas. Por sua vez, em condições de níveis máximas apresentou atividade enzimática de 11,47 U/mL.

Nota-se que os valores de atividade enzimática foram decrescendo com o aumento do pH, como por exemplo, comparando os ensaios 6 e 8. Também, houve diferenças de atividade com o tempo de reação, como visto nos ensaios 3 e 4. Ainda, verifica-se uma variação de atividade lipolítica com a concentração do óleo, como visto nos ensaios 1 e 5. Essas diferenças na atividade lipásica acontecem em virtude de alguns fatores que influenciam na produção das lipases como o pH do meio, tipo e concentração do carbono, tempo, entre outros (FRANÇA, 2021).

A fermentação submersa mostrou ser um processo bastante eficaz para a produção de enzimas lipolíticas promovendo resultados superiores (141,90 U/mL de atividade lipásica) aos da literatura (LIMA *et al.*,2019; ÇAGĀTAY & AKSU, 2021; LUZ *et al.*, 2021) em uma faixa de pH ainda não estudada num tempo de 24h utilizando o óleo de fritura residual. (LIMA *et al.*,2019; LUZ *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*,2019).

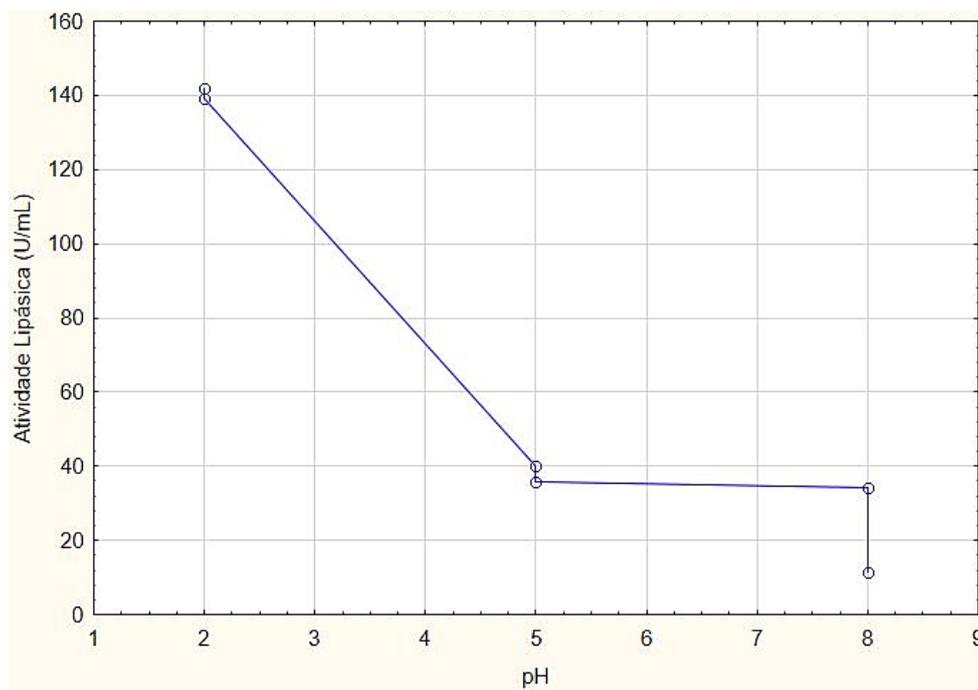
ÇAGĀTAY & AKSU (2021) utilizando resíduos de casca de laranja suplementado com 1% óleo de fritura residual como indutor e o fungo *Rhizopus arrhizus*, obtiveram aproximadamente 10 U/mL de atividade lipásica em 45 horas na faixa de pH neutro. Estes resultados foram inferiores em termos de atividade e tempo quando comparados aos obtidos nesta pesquisa.

LIMA *et al.* (2019) investigaram a produção de lipases usando o óleo de soja como fonte de carbono e o fungo da espécie *Aspergillus niger C*, obtiveram uma atividade lipásica de 27,46 U/mL em 72 horas na faixa de pH ácido. Apesar da concentração do óleo ser baixa, o tempo que levou para a produção das enzimas foi três vezes maior ao referido trabalho. LUZ *et al.* (2021) em seu estudo usando óleo comercial (1% v/v) e microrganismos isolados da espécie *Serratia marcescens* CCT 7796 e *Pseudomonas fluorescens* CCT 7797, obtiveram atividade lipolítica de 2,90 U/mL and 3,47 U/mL, respectivamente, em pH neutro. Observa-se resultado de atividade bem inferior, apesar da utilização de óleo comercial como substrato.

Em contrapartida, SOUZA *et al.* (2019) otimizou a produção de lipases utilizando o *Aspergillus terreus* e maior concentração de óleo de soja residual como fonte de carbono obtendo atividade lipásica de 1.905,23 U/mL após 192 horas e pH alcalino.

Analisando comportamento da atividade lipásica na faixa de pH estudada, conforme Figura 1, foi observado que em pH 2, a enzima produzida apresentou maiores valores de atividade lipásica, no ensaio 5 (141,90 U/ml) e ensaio 6 (139,03 U/ml). Estes resultados demonstram adaptação do microrganismo ao pH ácido. No entanto, quando em pH entre 5-8, houve diminuição da atividade como visto, por exemplo no ensaio 8 (11,47 U/mL). Diante disso, observa-se a influência do pH na atividade lipásica do *Aspergillus niger* nesse estudo.

Figura 1 – Comportamento da atividade lipásica produzida pelo *Aspergillus niger* em diferentes faixas de pH.



A análise de variância (ANOVA) (Tabela 4) revelou que o coeficiente de determinação foi de 99,4%. Assim, esses resultados demonstram que os dados previstos e experimentais para atividade lipásica estão coerentes quando comparados a outros que também utilizam óleos vegetais como fonte de carbono na produção de lipases (COSTA *et al.*, 2020).

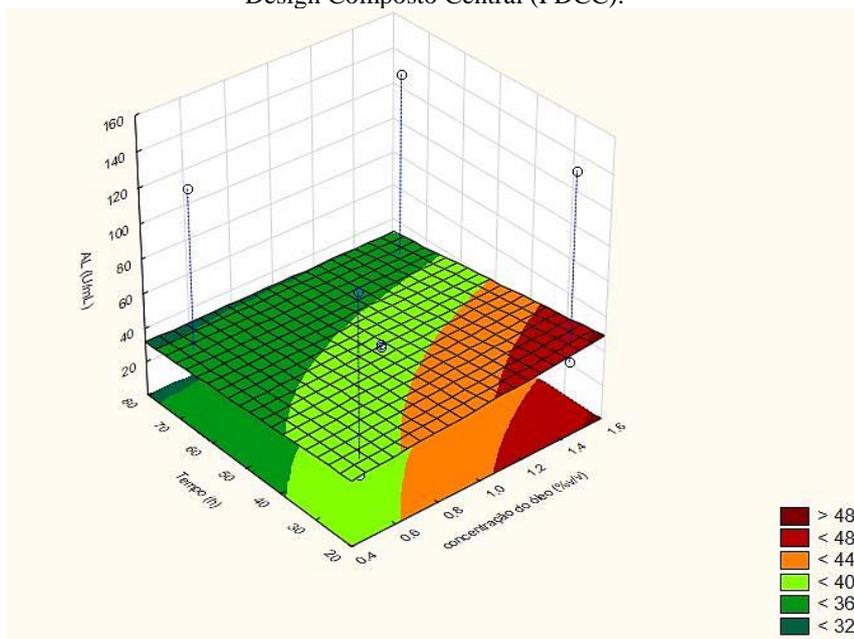
Os resultados do planejamento experimental foram avaliados pelos resultados apresentados na Tabela 4 através da análise de variância (ANOVA), por meio da qual se observou que pH (1L), tempo (2L) e a interação da concentração do óleo (%v/v) com o pH (1L com 2L) apresentaram influência significativa ao nível de 95% de confiança, uma vez que os valores de p são menores que 0,05. No entanto a variável concentração do óleo quando analisada isoladamente não apresentou influência significativa.

Tabela 4 - Análise de variância para o modelo que representa a atividade lipásica após 24 horas em fermentação submersa.

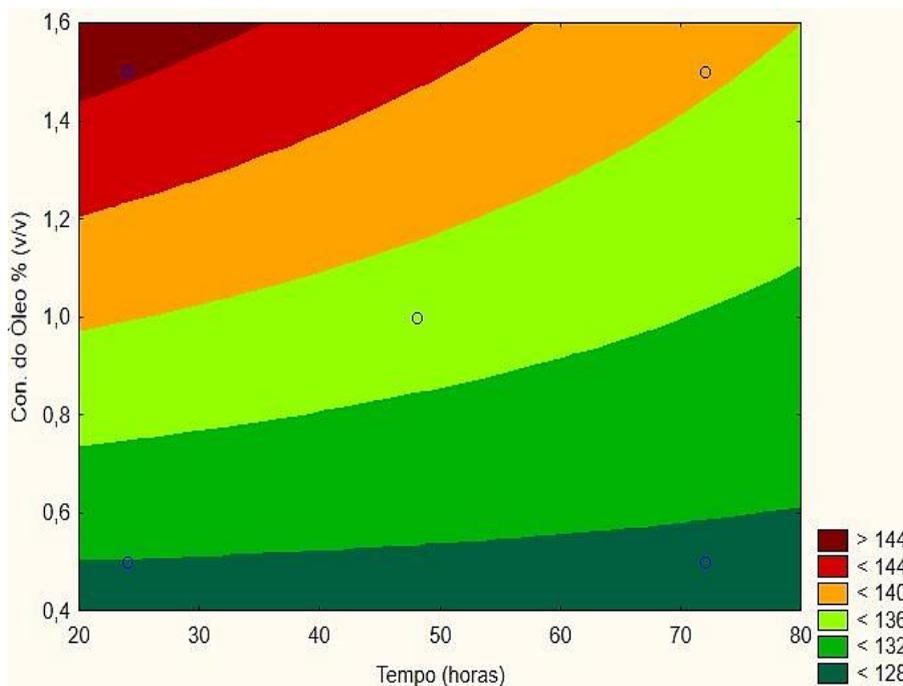
FONTE DE VARIAÇÃO	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	TESTE F	P-VALOR
(1) PH (L)	28573,58	2	4528,43	1888,607	0,000062
(2) CONC. ÓLEO (% V/V) (L)	50,35	1	50,35	3,328	0,142169
(3) TEMPO (H)(L)	173,63	1	173,63	11,476	0,027589
1L COM 2L	124,27	1	124,27	8,214	0,045655
1L COM 3L	50,35	1	50,35	3,328	0,142169
2L COM 3L	25,67	1	25,67	1,697	0,262665
ERROR	60,52	4	15,13		
TOTAL SS	29058,36	11			
COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO = 0,99427 (99,4%)					
F_{3:1;0,05} = 15,13					

A superfície de resposta e a curva de nível são apresentadas nas Figuras 2 (a) e (b), e representam a relação entre os efeitos das variáveis analisadas na atividade lipásica.

Figura 2 - (a) Superfície resposta e (b) gráfico de contorno prevista para atividade lipásica após 24 h de fermentação submersa em função da concentração do óleo % (v/v) e tempo (horas) em Planejamento Design Composto Central (PDCC).



2 (a)

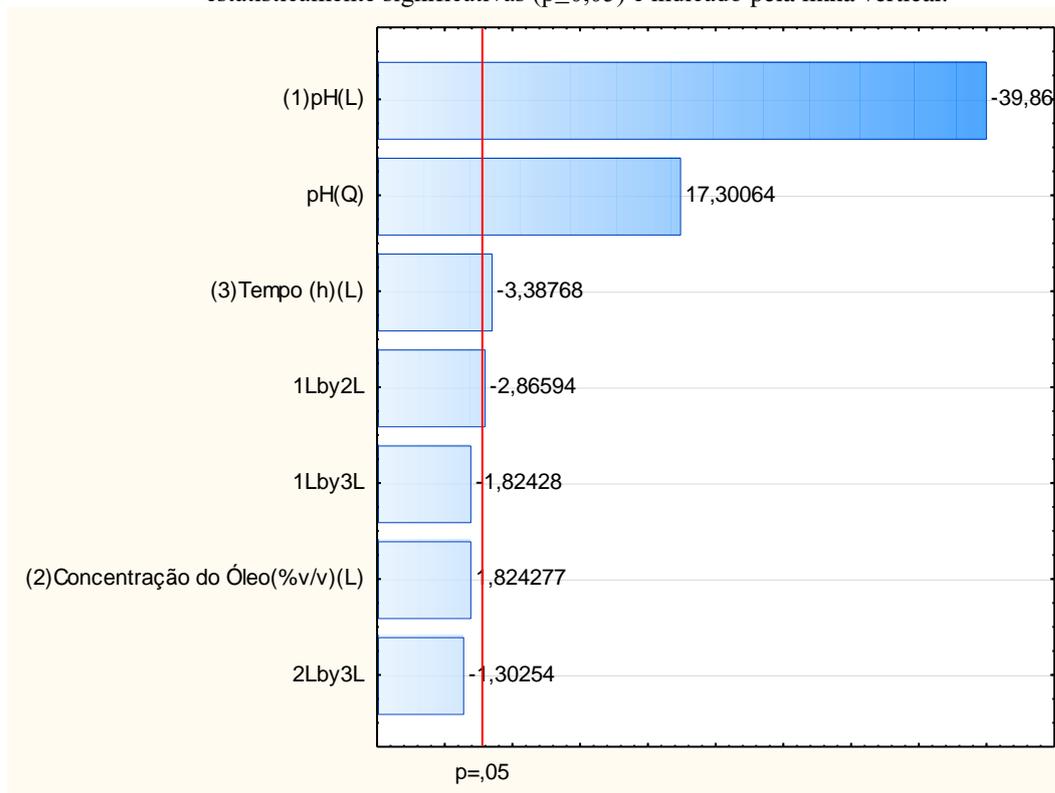


2 (b)

De acordo com as Figuras 2 (a, b), verifica-se uma maior tendência para atividade enzimática na faixa de concentração do óleo de 1,5 (% v/v) em 24 horas, com atividade lipásica máxima de 141,90 U/mL à 37°C e pH 2,0, de acordo com os resultados dispostos na Tabela 7.

A fim de validar os efeitos das variáveis independentes, foi gerado o Gráfico de Pareto (Figura 3) no software Statistica 12.0 (O ponto em que as estimativas de efeitos foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) é indicado pela linha vertical), por meio do qual se observou que o pH 2 (1 L) foi o fator que demonstrou maior efeito na variável de resposta (atividade lipolítica), e com menores efeitos o tempo (3L) e as interações do pH com a concentração do óleo (%v/v) (1L com 2L) ao nível de 95% de confiança. A concentração do óleo somente não apresentou influência significativa na produção das enzimas lipolíticas (Figura 3), que por sua vez a superfície resposta (Figura 2) demonstra um limite quando avaliamos a concentração do óleo com o pH para o consumo pelos microrganismos.

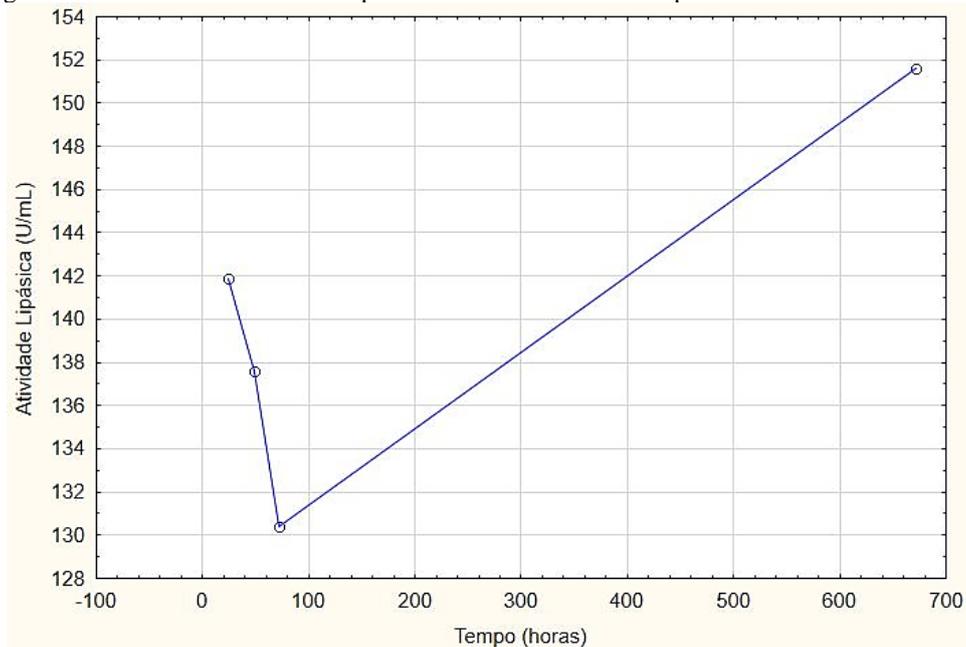
Figura 3 - Gráfico de Pareto de efeitos padronizados para a produção de lipases por *A. niger* de planejamento experimental fatorial composto central 2^3 . O ponto em que as estimativas de efeitos foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) é indicado pela linha vertical.



Resultados diferentes foram encontrados por LUZ *et al.* (2021) em seu estudo de otimização da produção de lipase por bactérias gram negativas em fermentação submersa, que apresentou máxima atividade enzimática em pH 7,0 e 37°C. LIMA *et al.* (2019) investigaram a produção de lipases usando fungo da espécie *Aspergillus niger C* e obtiveram através do planejamento experimental atividade lipásica em pH entre 5,0 e 6,0 à 55°C. SOUZA *et al.* (2019) otimizou a produção de lipases utilizando fungos da espécie *Aspergillus e*, obtiveram atividade lipásica máxima em pH 11 à 25°C. Nesta pesquisa, a atividade lipásica máxima foi obtida em pH ácido (pH 2,0) sendo destaque em comparação com outros autores (LIMA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2019; LUZ *et al.*, 2021; ÇAGĀTAY & AKSU, 2021) que muitos utilizaram faixas de pH entre 5,0 e 11,0, assim, colaborando nos estudos de produção de enzimas lipases.

Após os experimentos realizados para avaliar a estabilidade das lipases produzidas na faixa de temperatura entre 15°C a 37°C após 72 horas, foi possível verificar que o extrato bruto enzimático testado teve pouca variação de atividade lipásica de acordo com os resultados apresentados na Figura 4.

Figura 4 - Estabilidade da enzima após 28 dias submetidas a temperaturas entre 15 °C e 37 °C.



O extrato enzimático testado apresentou ótimos valores de atividade lipásica nas temperaturas avaliadas (Figura 4). A atividade inferior foi em 48 horas a $T = 15^{\circ}\text{C}$, uma perda de 3% da atividade lipásica em relação ao tempo de 24 h em virtude da mudança de temperatura. Deduz-se que a atividade lipásica produzida por meio do *Aspergillus niger* aumenta com diminuição da temperatura, sendo melhor condição em 15°C . Além disso, o extrato enzimático foi conservado no refrigerador (4°C), mantendo os valores de atividade de aproximadamente 153 U/mL, como também quando quantificado em termos de atividade lipásica após 28 dias nas temperaturas de 15°C e 30°C mantendo sua atividade.

LUZ *et al.* (2021) em seu estudo de otimização da produção de lipase por bactérias gram negativas em fermentação submersa, obtiveram estabilidade na temperatura de 37°C . Resultados diferentes foram encontrados por LIMA *et al.* (2019) quando testaram lipases de *Aspergillus niger C* obtidas por fermentação submersa e obtiveram estabilidade da enzima em 55°C . Sendo assim, esses autores (LUZ *et al.*, 2021 & LIMA *et al.*, 2019) demonstram que a estabilidade da enzima em relação ao pH e temperatura podem variar de acordo com o microrganismo utilizado, o que corrobora com os resultados encontrados.

4 CONCLUSÕES

A partir do uso óleo de fritura residual (OFR) como substrato, foram obtidos resultados de atividade lipásica acima de 100 U/mL, pois sendo um resíduo tem-se uma redução de custos na produção de extratos enzimáticos, além de utilizar um microrganismo de fácil obtenção.

Foi possível obter lipases com atividade de 141,90 U/mL em pH 2 numa temperatura ambiente por um período de 24 horas com concentração do óleo de fritura residual de 1,5 % v/v, além de garantir a estabilidade após 28 dias a uma temperatura de 15°C.

REFERÊNCIAS

ÇAGĀTAY, S.; AKSU, Z. **Use of different kinds of wastes for lipase production: Inductive effect of waste cooking oil on activity.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 132, n. 3, p. 234-240, 2021.

CASTRO, P.F.; MOREIRA, N. C.; ESPERANÇA, M. N.; OLIVEIRA, L. M.; BADINO, A. C.; TAVANO, O. L.; MENDES, A. A.; BASSO, R. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; HIRATA, D. B. **High lipase production from Geotrichum Candidum in reduced time using cottonseed oil: optimization, easy purification and specificity characterization.** Journal of chemical Engineering reserch updates, v. 3, n. 2, 2016.

COSTA, T. P.; SPENCER, P. V. D.; SOUZA, M. J.; ROCHA, A. C. P.; NELSON, D. L.; PINTO, N. A. V. D.; & BENASSI, V. M. **Standardization of the cultivation of the isolated filamentous fungus A4 for lipase production / Padronização do cultivo do fungo filamentoso isolado A4 para a produção de lipases.** *Brazilian Journal of Development*, 6(10), 76404–76423, out/2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-168>.

FARIAS, C. M.; SOUZA, O. C.; SOUSA, M. A.; CRUZ, R.; MAGALHÃES, O. M. C.; MEDEIROS, E. V.; MOREIRA, K. A.; SOUZA-MOTTA, C. M. **High-level lipase production by Aspergillus candidus URM 5611 under solid state fermentation (SSF) using waste from Siagrus coronata (Martius) Becari.** Revista African Journal of Biotechnology, v. 14, p. 820-828, mar/2015. DOI: 10.5897/AJB2014.14339.

FRANÇA, E.S. **Aproveitamento da borra de café para produção de lipases por fungos filamentosos isolados do rio Igarassu, PE, Brasil.** Mestrado em Desenvolvimento em Processos Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco. Recife – PE, 2021.

HARES JÚNIOR, S. J. **Conversão enzimática de triacilglicerídeos em mono e diacilglicerídeos de interesse industrial.** 2017. 117 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Programa de pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Universidade de São Paulo. São Paulo – SP, Brasil, 2017.

HECK, J. **Uma abordagem sobre a produção de lipases do gênero penicillium e suas potenciais aplicações biotecnológicas.** Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel – PR, 2021.

LIMA, L. G. R.; GONÇALVES, M. M. M.; COURI, S.; MELO, V. F.; SANT'ANA, G. C. F.; COSTA, A. C. A. **Lipase production by Aspergillus niger C. by submerged fermentation.** Revista Agriculture, Agribusiness and Biotechnology, vol. 62, 2019. ISSN: 1678-4324.

LUZ, B.D.S.; SARROUH, B.; BICAS, J.L.; LOFRANO, R.C.Z. **Lipase production by microorganisms isolated from the serra de Ouro Branco state park.** Revista Annals of the Brazilian academy of sciences, v. 93, n.1, 2021.

OLIVEIRA, B.H.; CORADI, G.V.; OLIVA-NETO, P.; NASCIMENTO, V.M.G. **Biocatalytic benefits of immobilized Fusarium sp. (GFC) lipase from solid state fermentation on free lipase from submerged fermentation.** Revista industrial crops and products, v. 147, may/2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112235>.

OLIVEIRA, H.S. de. **Efluente oleoso como alternativa para a produção de lipases por fungos.** Programa de pós-graduação em biologia de fungos – Universidade Federal de Pernambuco. Recife – PE, 2020.

RIGO, D.; GAYESKI, L.; TRES, G.A.; CAMERA, F.D.; ZENI, J. **Produção microbiológica de enzimas: uma revisão.** Revista Brazilian Journal of Development. Curitiba – PR, v. 7, n. 1, p. 9232-9254, jan. /2021. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-624>.

SOUZA, T.M.; XAVIER, K.A.S.; FONSECA, J.S.; SERUDO, R.L. **Bioprospecção de fungos filamentosos com atividade lipolítica.** Revista scientia amazonia, v.8, n. 2, B19-B20, 2019. ISSN: 2238-1910.