

**PRODUÇÃO DE LIPASES EM CULTIVO SUBMERSO POR  
BACTÉRIA TERMOFÍLICA UTILIZANDO RESÍDUO E  
COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS**

**APARECIDA SELSIANE SOUSA CARVALHO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO - 2019**

PRODUÇÃO DE LIPASES EM CULTIVO SUBMERSO POR  
BACTÉRIA TERMOFÍLICA UTILIZANDO RESÍDUO E  
COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

**APARECIDA SELSIANE SOUSA CARVALHO**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luana Pereira de Moraes

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO - 2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

C331

Carvalho, Aparecida Selsiane Sousa.

Produção de lipases em cultivo submerso por bactéria termofílica utilizando resíduo e coprodutos agroindustriais / Aparecida Selsiane Sousa Carvalho. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

76 f.

Bibliografia: 56 - 74.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2019.  
Orientadora: Luana Pereira de Moraes.

1. lipase microbiana. 2. Bacillus licheniformis. 3. farinha de laranja. 4. valorização de resíduos. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

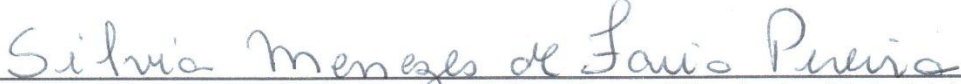
PRODUÇÃO DE LIPASES EM CULTIVO SUBMERSO POR  
BACTÉRIA TERMOFÍLICA UTILIZANDO RESÍDUO E  
COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

**APARECIDA SELSIANE SOUSA CARVALHO**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Aprovada em 28 de fevereiro de 2019

Comissão examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup> Silvia Menezes de Faria Pereira (D.Sc., Eng. e Ciência dos Materiais) – UENF

  
\_\_\_\_\_  
Prof. João Batista Barbosa (D.Sc., Tecnologia de Alimentos) – IF Sergipe

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Josilene Lima Serra (D.Sc., Microbiologia de Alimentos) – IF Maranhão

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Luana Pereira de Moraes (Ph.D., Ciência e Tecn. de Alimentos) - UENF  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meus caminhos, me fortalecer nos momentos de fraqueza e por, durante toda minha vida, cuidar de mim. Obrigada, Senhor!

Aos meus pais, Vanusa e Salvador, os grandes amores da minha vida, por todo amor, cuidado, força, incentivo e apoio no sonho que escolhi para tornar realidade ainda adolescente e, também, por me proporcionarem a base familiar necessária para minha formação como ser humano. Sem eles, eu jamais chegaria até aqui;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudo;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em especial, ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal pelo suporte para realização deste trabalho;

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luana Pereira de Moraes por me acompanhar em cada passo deste projeto como uma grande incentivadora. Por corrigir quando necessário e ensinar de forma afetuosa, e por toda compreensão e presença ao longo destes 2 anos de mestrado;

À minha coorientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Meire Lelis Leal Martins por todos os ensinamentos e empenho na realização deste projeto, pelo incentivo e pela confiança;

A Aninha, por me ajudar durante a realização dos experimentos e transmitir com carinho ensinamentos sobre técnicas adquiridas durante seus anos de

experiência no laboratório. Agradeço também pela amizade, incentivo e pelo café da tarde que sempre nos alertava para continuar os trabalhos;

Ao meu irmão Pablo, às minhas avós, Maria e Ilca, aos meus tios e tias que sempre acreditaram na realização deste projeto;

À minha grande amiga e irmã de coração, Ruth de Abreu, pelo companheirismo e apoio durante estes dois anos. Por dividir um pouco da imensidão que és, e também dividir tantas risadas e algumas tristezas de percurso;

Às minhas amigas Luana e Thaisa, que me acolheram em Campos quando ainda nem me conheciam, dividiram tantos cafés, as contas e um bocado de risadas. Obrigada pela confiança, pela companhia e por tantas conversas esclarecedoras sobre o mundo e suas experiências. Ter vocês para dividir o lar, também foi um grande presente de Deus!

A Érica Cruz, por ser uma grande parceira e amiga no laboratório. Agradeço por me apoiar e pela preocupação constante com meu bem-estar. Cresci muito ouvindo suas histórias e sua experiência de vida. Obrigada por dividir comigo momentos tão bons e leves no laboratório!

Ao Setor de Microbiologia Industrial e de Alimentos do Laboratório de Tecnologia de Alimentos do CCTA;

Ao Almy Junior por todo apoio, amizade, pelos conselhos e ensinamentos. Agradeço também por me apresentar a UENF. Graças a você, conheci esta universidade que ficará eternamente na marcada na minha trajetória;

A todos que contribuíram de alguma forma para a concretização desta etapa.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	OBJETIVOS .....	4
2.1	Objetivo geral .....	4
2.2	Objetivos específicos .....	4
3.	REVISÃO DE LITERATURA .....	6
3.1	Enzimas .....	6
3.2	Enzimas de origem microbiana .....	8
3.3	Lipases.....	10
3.4	Produção de lipases por microrganismos termofílicos .....	13
3.5	Aplicação industrial de lipases .....	15
3.6	Aproveitamento de resíduo e coprodutos agroindustriais na produção de enzimas	16
3.6.1	Farinha de Laranja .....	17
3.6.2	Farinha de Uva.....	18
3.6.3	Melaço.....	19
3.6.4	Óleo vegetal residual de fritura.....	19
3.7	Planejamento experimental.....	20
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
4.1	Materiais.....	22
4.1.1	Microrganismo .....	22
4.1.2	Meio de cultura .....	23

4.2	Métodos .....	24
4.2.1	Preparo do meio de cultura para produção de lipase .....	24
4.2.2	Crescimento da bactéria e preparo do inóculo .....	24
4.2.3	Influência da aplicação das farinhas de laranja, uva, melão e resíduo de óleo de cozinha industrial para produção de lipases.....	25
4.2.4	Planejamento experimental do tipo DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional.....	26
4.2.4.1	Otimização do meio para produção de lipases utilizando DCCR - Efeito da farinha de laranja (FL), resíduo de óleo de cozinha industrial (ROI) e do tempo do processo fermentativo .....	26
4.2.4.2	Estudo das condições de produção de lipase utilizando o DCCR - Efeito do pH e temperatura do processo fermentativo .....	27
4.2.5	Determinação do pH.....	27
4.2.6	Obtenção do extrato enzimático .....	27
4.2.7	Atividade lipolítica.....	28
4.2.8	Avaliação da presença das enzimas protease, avicelase, carboximetilcelulase, amilase, xilanase e lipase no meio otimizado .....	29
4.2.8.1	Protease .....	29
4.2.8.2	Avicelase (Exo- $\beta$ -1, 4- Glucanase) e Carboximetilcelulase ( $\beta$ -1, 4- endoglicanase).....	30
4.2.8.3	$\alpha$ -amilase.....	31
4.2.8.4	Xilanase (endo-1,4- $\beta$ -xilanase).....	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
5.1	Estudo da influência da aplicação das farinhas de laranja, uva, melão e resíduo de óleo de cozinha industrial para produção de lipases.....	34
5.2	Otimização do meio para produção de lipases utilizando DCCR - Efeito da farinha de laranja (FL), resíduo de óleo de cozinha industrial (ROI) e do tempo do processo fermentativo .....	37
5.3	Estudo das condições de produção de lipase utilizando o DCCR - Efeito do pH e temperatura .....	48
5.4	Avaliação da presença das hidrolases: protease, avicelase, carboximetilcelulase, amilase e xilanase .....	52
6.	RESUMO E CONCLUSÕES .....	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações catalisadas pela enzima lipase. Fonte: Ghanem, (2007). .....	12
Figura 2. Hidrólise do p-nitrofenilbutirato por lipase (Zaid et al., 2015). .....	28
Figura 3. Superfície de resposta 3D: Atividade lipolítica com o tempo fixo no ponto central. ....	41
Figura 4. Superfície de resposta 3D: atividade lipolítica com ROI fixo no ponto central. ....	41
Figura 5. Superfície de resposta 3D: atividade lipolítica com FL fixo no ponto central. ....	42
Figura 6. Superfície de resposta 3D: pH com o tempo fixo no ponto central. ....	46
Figura 7. Superfície de resposta 3D: pH com ROI fixo no ponto central. ....	46
Figura 8. Superfície de resposta 3D: pH com FL fixo no ponto central. ....	47
Figura 9. Diagrama de Pareto para a atividade lipolítica, em nível de 5% de significância em meio contendo FL, ROI durante 42h de fermentação a 150 rpm. ....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo a reação catalisada Fonte: Lima et al. (2001).....	8
Tabela 2. Composição físico-química das farinhas de laranja, uva e do melaço Fonte: Relva Verde .....	23
Tabela 3. Qualidade físico-química do resíduo de óleo de cozinha industrial.....	24
Tabela 4. Concentrações das fontes de carbono que foram estudadas .....	25
Tabela 5. Delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2 <sup>3</sup> com os níveis das variáveis independentes: Farinha de laranja (FL), Resíduo de óleo de cozinha industrial (ROI) e tempo de fermentação .....	26
Tabela 6. Delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2 <sup>2</sup> com os níveis das variáveis independentes: pH e temperatura, para a produção de lipase .....	27
Tabela 7. Atividade da lipase com o meio contendo FL, FU e MEL em diferentes concentrações.....	34
Tabela 8. Matriz do DCCR 2 <sup>3</sup> com os valores codificados e os valores reais das variáveis independentes estudadas .....	38
Tabela 9. Análise de variância realizada para a resposta atividade lipolítica por <i>Bacillus licheniformis</i> no meio contendo FL e ROI com tempo de fermentação variável.....	39
Tabela 10. Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo matemático para atividade lipolítica conforme o DCCR.....	39

Tabela 11. Análise de variância realizada para a resposta pH do meio contendo FL e ROI com tempo de fermentação variável por <i>Bacillus licheniformis</i> .....	45
Tabela 12. Coeficiente de regressão dos parâmetros para a resposta pH conforme o DCCR.....	45
Tabela 13. Matriz do DCCR 2 <sup>2</sup> com os valores codificados e os valores reais das variáveis independentes estudadas com o meio de cultura otimizado.....	48
Tabela 14. ANOVA para pH final do meio contendo FL, ROI durante 42h de fermentação, a 150 rpm por <i>Bacillus licheniformis</i> .....	50
Tabela 15. Atividade enzimática de hidrolases no meio otimizado contendo FL, ROI durante 42h de fermentação, a 150 rpm por de <i>Bacillus licheniformis</i> .....	52

## RESUMO

CARVALHO, Aparecida Selsiane de Sousa; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2019. Produção de lipases em cultivo submerso por bactéria termofílica utilizando resíduo e coprodutos agroindustriais. Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luana Pereira de Moraes.

Lipases são enzimas de grande relevância para tecnologia enzimática, sendo responsáveis pela hidrólise das gorduras, óleos e ésteres de ácidos graxos. Objetivou-se com o presente trabalho estudar a produção de lipases por *Bacillus licheniformis* utilizando os coprodutos agroindustriais: farinhas de uva (FU), farinha de laranja (FL) e o melaço (MEL) como fontes de carbono, além do resíduo de óleo de cozinha industrial (ROI) como fonte indutora, obtendo-se um meio que forneça máxima produção enzimática. Preparou-se o inóculo com a bactéria e estudou-se a influência da aplicação da FL, FU, MEL e ROI para produção de lipases. Posteriormente, a FL foi selecionada para o estudo do tempo de fermentação interagindo com os componentes do meio escolhido para produção de lipases utilizando um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), onde as variáveis independentes foram FL, ROI e tempo de fermentação. O efeito do pH e da temperatura (°C) foram estudados após a obtenção das melhores condições do meio de cultura através do planejamento DCCR. Após a obtenção das melhores condições do meio e do processo fermentativo para a produção de lipases, realizou-se análises para a detecção da presença de outras enzimas como: protease, avicelase, carboximetilcelulase, amilase, xilanase e lipase. Os resultados

alcançados apontaram que as fontes FL, FU, MEL ao serem combinadas com ROI para a produção de lipase por bactéria termofílica possibilitaram a produção da enzima em todos os tratamentos estudados, porém a FL se destacou entre eles quando utilizada na concentração 0,50 (% m/v). O estudo da otimização do meio para a produção de lipases utilizando o DCCR do tipo 2<sup>3</sup> demonstrou uma região ótima, onde, quando fixado o tempo de fermentação no ponto central (42h), as concentrações de FL e de ROI demonstraram uma melhor atividade enzimática em torno de 0,50 (% m/v) e entre 0,55 e 0,75 (% m/v), respectivamente. A partir do estudo do pH e da temperatura de incubação do meio através do DCCR do tipo 2<sup>2</sup>, não foi possível a construção de superfícies de resposta, pois o modelo não foi significativo em nível de significância de 5% para a atividade lipolítica através da ANOVA pelo teste F calculado. Também, detectou-se a presença de todas as hidrolases pesquisadas, confirmando a capacidade do *Bacillus licheniformis* de sintetizá-las, exceto da enzima carboximetilcelulase, e com destaque para a protease, que apresentou atividade de 11,6 U.mL<sup>-1</sup>. A partir do estudo realizado, conclui-se que *Bacillus licheniformis* possui potencial para produzir lipases e protease, bem como as demais enzimas pesquisadas utilizando resíduos e coprodutos, sendo de grande importância para a tecnologia enzimática.

## ABSTRACT

CARVALHO, Aparecida Selsiane de Sousa; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2019. Lipase production in submerge cultivation by thermophilic bacteria using waste and agro-industrial co-products. Advisor: Luana Pereira de Moraes. Co-advisor: Meire Lelis Leal Martins.

Lipases are enzymes of great relevance to enzymatic technology, being responsible for the hydrolysis of fats, oils and fatty acid esters. The purpose of this work was to study the production of lipases by *Bacillus licheniformis* using the agroindustry co-products: grape flour (GF), orange flour (OF) and molasses (MOL) as carbon sources, using waste cooking oil (WCO) as an inducing source, providing a medium which gives maximum enzyme production. The inoculum was prepared with the bacteria and the influence of the application of GF, OF, MEL and WCO for lipase production was studied. The OF was selected for the study of fermentation time interacting with the components of the chosen medium for lipase production using a Rotational Composite Central Design (RCCD), in which the independent variables were FL, ROI and incubation time. The effect of pH and temperature (°C) were studied after obtaining the best conditions for the culture medium through DCCR planning. After obtaining the best conditions for the medium and the fermentative process for the production of lipases, analyzes were performed to detect the presence of other enzymes such as protease, avicelase, carboxymethylcellulase, amylase and xylanase. The results showed that the sources FL, FU, MEL when combined with WCO for the production of lipase by thermophilic bacteria allowed

the enzyme production in all studied treatments, but the FL stood out among them, when used in the concentration 0.50 (% m/v). The study of the optimization of the medium for lipase production using the type 2<sup>3</sup> DCCR showed an optimal region where, when the fermentation time at the central point (42h) was fixed, the OF and WCO concentrations showed a better enzymatic activity in around 0.50 (% m/v) and between 0.55 and 0.75 (% m/v), respectively. In the study of pH and incubation temperature of the medium through DCCR type 2<sup>2</sup>, it was not possible to construct response surfaces, since the model was not significant at 5% significance level for lipolytic activity through ANOVA by F test. Also, the presence of all hydrolases was detected, confirming the ability of *Bacillus licheniformis* to synthesize them, except for the carboxymethylcellulase enzyme, especially the protease, which showed 11.6 U.mL<sup>-1</sup> activity. The study concluded that *Bacillus licheniformis* has the potential to produce lipases and protease, as well as the other enzymes researched using residues and co-products, being of great importance for enzymatic technology.

## 1. INTRODUÇÃO

Os processos enzimáticos são uma alternativa cada vez mais atrativa para os diversos ramos industriais, devido, principalmente às atuais exigências por processos mais sustentáveis que englobam os princípios da química verde e também, às limitações durante a obtenção de produtos ou intermediários específicos que possuam grande importância industrial (Resende et al., 2017). O mercado de enzimas inclui diversos setores industriais, dentre eles: os setores de alimentos e bebidas, produtos de limpeza, produção de biocombustíveis, alimentos para animais e aplicações especiais - pesquisa e biotecnologia, diagnósticos e biocatalisadores (Freedonia, 2016).

Embora as enzimas possam ser encontradas em animais, plantas e produzidas por microrganismos, para sua produção em nível industrial, as enzimas de origem microbianas são preferíveis por exigir menores tempos durante sua produção, alto rendimento, facilidade de manipulação, e principalmente, porque são mais ativas e estáveis (Nagarajan, 2012; Liu e Kokare, 2017).

Em relação à obtenção de enzimas por microrganismos para aplicação industrial, espera-se que os mesmos produzam enzimas estáveis dentro das condições em que foram produzidas. Assim, dentre o grande grupo de produtores de compostos de interesse biotecnológico, destacam-se os microrganismos termofílicos devido à sua capacidade de trabalhar em elevadas temperaturas, sendo mais úteis e desejáveis para a indústria por possuírem uma maior taxa de reação (Burcu Bakir e Metin, 2017). Como exemplos de microrganismos



termofílicos, têm-se as bactérias do gênero *Bacillus* que produzem enzimas que atuam em condições severas de temperatura, operação e armazenamento (Dharmsthiti e Luchai, 1999).

Além da escolha adequada do microrganismo que será utilizado no processo fermentativo para produção da enzima de interesse, é necessária a definição do meio de cultivo adequado, como uma fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e outros compostos essenciais para o desenvolvimento do microrganismo produtor (Schmidell et al., 2001).

Como forma de reduzir os custos dessa produção, pode-se substituir alguns componentes do meio de cultivo por resíduos agroindustriais no processo biotecnológico (Almeida, 2012; Santos, 2012; Morais Júnior, 2013; Penha et al., 2016). Os resíduos e coprodutos oriundos do processamento de frutas, como a uva, laranja, e o melaço da cana, são uma excelente fonte de fibras, como demonstrado por Hernandes (2014) e Tozatti (2013), sendo interessante o seu uso devido à geração de biomassa oriunda do processamento desses vegetais no Brasil, o que os torna uma alternativa interessante em substituição a outras fontes de carbono.

As lipases, enzimas responsáveis pela hidrólise das gorduras insolúveis, óleos e ésteres de ácidos graxos, têm sido de grande importância no cenário econômico. As lipases microbianas são principalmente extracelulares, e sua produção é fortemente influenciada pelos tipos de fontes de carbono (Veerapagu et al., 2013), sendo produzidas, geralmente, na presença de um algum lipídio indutor, como óleos ou gordura (Gupta et al., 2004). Para Roveda e Colla (2010), é interessante estudar a utilização de indutores como o óleo de soja proveniente de frituras devido à fácil obtenção visto que o mesmo é um resíduo de restaurantes e da indústria.

Tais enzimas são consideradas excelentes substâncias para síntese química clássica, devido à sua versatilidade em catalisar inúmeras reações, o que amplia sua aplicação e possibilita a utilização em diversos setores (Barros et al., 2010). Dentre os processos biotecnológicos que as lipases vêm sendo aplicadas, pode-se citar os que são utilizados na indústria de detergentes, cosméticos, produção de papel, de alimentos, biodiesel e síntese de biopolímeros, entre outros. Porém, seu uso pode ser limitado pelo seu alto custo de produção (Anobom et al., 2014).

A redução do custo do processo fermentativo e a máxima produção de lipases podem ser atingidos através da otimização do meio de cultura utilizado para sua produção e das condições físico-químicas, sendo de grande relevância para o aumento da produtividade e obtenção do produto de interesse (Costa, 2017). Existem inúmeros trabalhos que relatam a otimização de diferentes meios para o crescimento microbiano, porém cada microrganismo possui suas características, sendo necessário realizar o estudo do meio de cultura e condições físico-químicas necessárias considerando as particularidades e exigências individuais de cada um.

Tendo em vista o contexto apresentado, objetivou-se com o presente trabalho estudar a produção de lipases por *Bacillus licheniformis* utilizando farinhas da casca da uva, laranja, melão e resíduo de óleo de cozinha industrial obtendo-se um meio em que a máxima produção enzimática será alcançada a um custo reduzido de produção com menor impacto ambiental.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estudar a produção de lipases por *Bacillus licheniformis* em fermentação submersa utilizando como substratos coprodutos agroindustriais e resíduo de óleo de cozinha industrial como fonte indutora.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência de diferentes coprodutos industriais: farinha de laranja (FL); farinha de uva (FU) e melaço (MEL) como fontes de carbono para produção de lipases;
- Selecionar a melhor fonte de carbono para produção de lipases pelo *Bacillus licheniformis* em fermentação submersa;
- Estudar o efeito da farinha de laranja (FL) e da fonte indutora lipídica – resíduo de óleo de cozinha industrial (ROI), bem como do tempo de fermentação – através do delineamento composto central rotacional (DCCR) sobre a produção de lipases e pH final do meio;
- Estudar o efeito do pH e da temperatura através do DCCR sobre a produção de lipases na melhor condição e meio obtidos no planejamento anterior;
- Verificar a produção de diferentes enzimas, tais como: protease,

avicelase, carboximetilcelulase, amilase e xilanase nas condições ótimas de produção lipolítica por *Bacillus licheniformis* encontrada no planejamento experimental;

- Avaliar os resultados da atividade enzimática e pH através da análise de variância e teste F, e posteriormente construir modelos e superfície de resposta em relação aos mesmos quando possível.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reações químicas que ocorrem nas células e organismo sem se consumir, não alterando o equilíbrio químico característico da reação. São eficientes do ponto de vista energético por operarem a temperaturas e pressões moderadas, bem como em uma ampla faixa de pH, e, além disso, as enzimas aceleram uma reação reversível em dois sentidos (Cabral et al., 2003).

As enzimas são, em sua maioria, proteínas, polímeros complexos formados por uma sequência de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas, exceto por um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas. Têm pesos moleculares variando de 12.000 a mais de um milhão de daltons (Da), e grande parte necessita de um componente químico adicional, que pode ser um ou mais íons inorgânicos como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , e/ou uma molécula orgânica ou metalorgânica complexa denominada coenzima, sendo a maioria derivada de vitaminas (Nelson e Cox, 2014).

Atuam de forma seletiva e específica sobre o substrato, e segundo o modelo inicial proposto por Emil Fischer em 1894, o sítio ativo (região onde ocorre a reação) possui uma forma geométrica única que é complementar à do substrato (molécula que se liga ao sítio ativo e sobre a qual a enzima atua) que se enquadra nela (Illanes, 2008). Contudo, um outro modelo prevê um sítio de ligação não

totalmente rígido, mas sim moldável à molécula, onde a enzima se ajustaria à molécula do substrato e vice-versa. É o modelo de encaixe induzido proposto por Daniel E. Koshland Jr., em 1959 (Berg et al., 2004).

O sítio ativo ou centro ativo é composto por pequenas regiões constituídas pelos grupos que estão diretamente envolvidos na catálise, denominado de centro catalítico, e também, locais para a ligação específica dos substratos, conhecidos como centro de ligação dos substratos. Algumas enzimas possuem, além desse centro ativo, os centros alostéricos, que se ligam a moléculas menores e inibem ou ativam a ação enzimática (Cabral et al., 2003).

A especificidade quanto ao substrato deriva da presença de ligações, na sua molécula, que podem ser atacadas por grupos funcionais do sítio ativo da enzima e da presença de grupos funcionais que se ligam à enzima permitindo a fixação e posicionamento correto no sítio ativo para que a reação ocorra. Sua atividade é medida através da velocidade da reação em que participa, e é determinada em condições experimentais estabelecidas, sendo que, a concentração de produto formado aumenta linearmente em um dado intervalo de tempo, em uma velocidade de reação constante (Lima et al., 2001).

A atividade catalítica das enzimas depende completamente da integridade da sua conformação nativa, ou seja, se uma enzima for degradada até os aminoácidos que a compõem ou desnaturada ou dissociada nas suas subunidades, a atividade catalítica é perdida (Nelson e Cox, 2014). Entre os fatores que podem afetar a atividade enzimática, estão: a concentração do substrato, temperatura, pressão, pH e cofatores (Scanlon et al., 2018).

Quanto à classificação, as enzimas podem ser divididas em seis classes segundo a reação catalisada (Tabela 1), sendo que cada enzima possui um código (EC *number*) que, por sua vez, é constituído de quatro algarismos. O primeiro número se refere à classe da enzima (1 a 6), o segundo à subclasse (ao tipo de reação ou grupo sobre o qual atua), o terceiro à subclasse (aos grupamentos específicos que participam da reação), e o quarto refere-se ao número de ordem da enzima dentro da subclasse (enzima propriamente dita) (Lima et al., 2001; NC-IUBMB, 2018).

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo a reação catalisada

<i>Dígito da classe</i>	<i>Classe da enzima</i>	<i>Tipo de reação catalisada</i>
1	Oxidoredutase	Reações de oxidação-redução
2	Transferases	Transferência de 1 átomo ou grupo entre moléculas
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liasas	Remoção de um grupo de uma molécula sem ser por hidrólise
5	Isomerasas	Reações de isomerização
6	Ligases	Reações de síntese acopladas à hidrólise de 1 molécula de ATP

Fonte: Lima et al. (2001)

As hidrolases são as enzimas mais utilizadas na indústria alimentícia. Essas enzimas catalisam reações adicionando uma molécula de água e quebrando as ligações químicas das famílias de macromoléculas: carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, sendo capazes de lisar diferentes substratos. Entre essas, incluem-se: amilases, celulasas, pectinases, proteases e lipases (Ventura-Sobrevilla et al., 2015). Dentre as enzimas da classe de hidrolases, as lipases são enzimas que possuem propriedades bastante interessantes para o uso industrial (Castro et al., 2004; Dekker e Daamen, 2011; Uppada et al., 2017). As enzimas podem ser de origem animal, vegetal e microbiana. Porém, os microrganismos têm sido a principal fonte de obtenção destas enzimas (Barros et al., 2010).

### 3.2 Enzimas de origem microbiana

As enzimas para aplicação industrial têm sido obtidas através dos microrganismos eucariotos (fungos e leveduras) e dos procariotos (bactérias), como demonstrado por Treichel et al. (2010). Os microrganismos utilizados na produção dessas enzimas devem ser reconhecidos como seguros (*Generally Recognized as Safe* - GRAS), sem efeitos adversos para os seres humanos (Illanes, 2008).

A obtenção de microrganismos de interesse industrial ocorre de diversas formas: a partir do isolamento de recursos naturais, compra em coleções de culturas, obtenção de mutantes naturais, mutantes induzidos por métodos

convencionais e de microrganismos recombinantes por técnicas de engenharia genética. O isolamento dos microrganismos a partir de recursos naturais ainda é uma atividade extremamente relevante na obtenção de novas linhagens de interesse industrial, por conduzir à descoberta e produção máxima de novos produtos pelas linhagens, mesmo que signifique um custo elevado devido à quantidade de experimentos envolvidos (Schmidell et al., 2001).

A produção de enzimas por microrganismos é mais conveniente do ponto de vista econômico pelo alto rendimento na produção, e devido também ao crescimento rápido das culturas que liberam as enzimas, o que possibilita rapidez no processo, algo que é extremamente desejável para a indústria biotecnológica. São requeridas, também, devido à ausência de flutuações sazonais na sua obtenção, o que não ocorre com as enzimas de origem animal e vegetal. Além disso, as cepas microbianas permitem facilidade na manipulação genética para aumentar o rendimento na produção enzimática (Hasan et al., 2006).

Para produção de enzimas microbianas existem dois métodos de fermentação: a Fermentação em Estado Sólido (FES) e a Fermentação Submersa (FS). A fermentação em estado sólido ou fermentação semissólida, aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos com pouca atividade de água. Já na fermentação submersa, a biomassa microbiana é envolvida pelo meio de cultivo líquido (Rocha, 2010). Geralmente, as enzimas e outros metabólitos microbianos são produzidos por Fermentação Submersa, devido à facilidade no controle do processo e na recuperação das enzimas (Farias, 2013).

Vários fatores afetam a produção enzimática, entre eles estão: o pH, a temperatura, a composição do meio, o preparo do inóculo, a aeração, a agitação, as fontes de carbono e nitrogênio e a concentração de oxigênio dissolvido (Colla et al., 2012). Uma vez que a composição do meio e as condições de produção afetam a produção enzimática, é importante compreender a influência desses vários fatores para determinar as condições ótimas de cultivo (Roveda e Colla, 2010). Além desses fatores, a escolha do microrganismo adequado para o processo é essencial, pois uma mesma espécie microbiana pode secretar enzimas com características completamente ou parcialmente diferenciadas (Muruci, 2012).

Os microrganismos podem produzir diversas enzimas simultaneamente em um mesmo meio de cultura e esta produção através de processos fermentativos foi relatada por diversos autores (Qureshi et al., 2016; Esmaeili et al., 2015; Sánchez



Blanco et al., 2016; Negi e Banerjee, 2009). Dentre estas enzimas foram relatadas na literatura: proteases (Pant et al., 2015; Patil et al., 2018), celulase (Marí et al., 2018), amilases (Frantz et al., 2018), poligalacturonases (Wong et al., 2017), xilanases (Kumar e Shukla, 2018) e lipases (Geoffry e Achur, 2018).

### 3.3 Lipases

As lipases, enzimas que pertencem à família das hidrolases (E.C.3.1.1.3 triacilglicerol éster hidrolase), catalisam a hidrólise das ligações éster em triacilgliceróis para produzir diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol em condições aquosas e, a síntese de ésteres em solventes orgânicos (Mendes et al., 2012; Saraswat et al., 2017). A catálise hidrolítica das ligações éster ocorre na interface entre a fase de substrato insolúvel e a fase aquosa, enquanto que em condições não aquosas, as mesmas catalisam a reação inversa (como a esterificação, interesterificação e transesterificação) produzindo acilgliceróis a partir de glicerol e ácidos graxos (Saxena et al., 2003).

O mecanismo de catálise interfacial é o aumento significativo na atividade lipolítica observada na presença de interface lipídio-água, sendo uma característica única das lipases. Essas enzimas são adaptadas para atuarem na interface de um sistema de duas fases no qual o substrato se encontra na forma de um agregado de moléculas de éster ou micelas interagindo com um meio aquoso (Verger, 1997).

A atividade da lipase em função da composição interfacial é atribuída à inacessibilidade do substrato, pois na ausência das interfaces hidrofóbicas, as lipases possuem alguns elementos de estruturas secundárias denominadas “tampas” que cobrem seus sítios ativos (sítios estes formados pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu) e os tornam inacessíveis para os substratos. No entanto, na presença dessas interfaces ocorrem mudanças na conformação da lipase que produz sua estrutura aberta, causando a exposição da superfície hidrofóbica que interage com a interface hidrofóbica e confere funcionalidade à enzima (Reis et al., 2009).

Esse mecanismo de ativação da catálise interfacial, e, a presença da tampa hidrofóbica ou lid (cadeia de aminoácidos do tipo  $\alpha$ -hélice) ocorre na maioria das lipases, com algumas exceções. O mesmo mecanismo foi por algum tempo utilizado para distinguir as lipases das esterases (EC. 3.1.1.1), porém, estudos

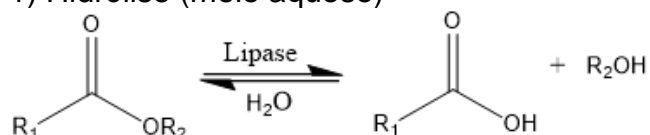
mostraram que as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica B*, *Burkholderia glumae* foram ativas em substratos não emulsionados e não mostraram ativação interfacial mesmo possuindo a lid (Verger, 1997; Jaeger e Reetz, 1998). Assim, a presença da tampa hidrofóbica e a ativação interfacial não são critérios adequados para classificar as enzimas como lipolíticas, sendo que a lipase pode ser classificada como uma carboxilesterase que catalisa preferencialmente a hidrólise de triacilglicerídeos de cadeia longa com dez ou mais átomos de carbono (ligações éster tríplexes), enquanto as esterases atuam sobre triacilglicerídeos com ácidos graxos de cadeia curta com menos de dez átomos de carbono (Jaeger e Reetz, 1998).

Os processos de obtenção de lipases possuem uma aplicação vantajosa, principalmente pelas especificidades das lipases, proporcionando reações eficientes com baixa formação de subprodutos (Schmid et al., 2001). Essas especificidades podem ser divididas nos seguintes grupos (Villeneuve, 2003; Sharma e Kanwar, 2014).

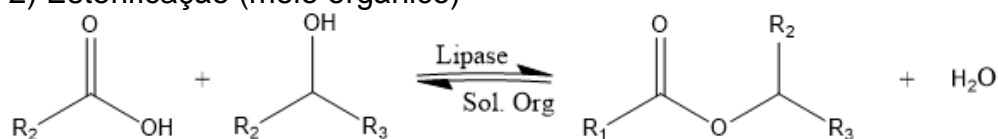
- 1) Especificidade do substrato: os substratos naturais das lipases são ésteres de glicerol, assim, a especificidade do substrato é definida pela capacidade da lipase em hidrolisar especificamente um tipo de ésteres de glicerol;
- 2) Regiosseletividade ou especificidade posicional: é a preferência de uma direção de fabricação de ligações químicas ou quebra em todas as direções possíveis. É subdividida nos seguintes tipos:
  - a) Lipases não específicas: catalisam a hidrólise completa de triacilgliceróis em ácidos graxos de forma aleatória;
  - b) Lipases 1,3 específicas: hidrolisam apenas triacilgliceróis nas ligações de glicerol C1 e C3, produzindo ácidos graxos, 2-monoacilgliceróis e 1,2-diacilgliceróis ou 2,3-diacilgliceróis.
- 3) Estereoespecificidade: habilidade de discriminar enantiômeros em uma mistura racêmica, as enantiosseletivas, sendo que essa capacidade pode variar de acordo com o substrato e esta variação pode estar ligada à natureza química do substrato (Castro e Anderson, 1995).

As reações catalisadas pelas lipases incluem duas principais categorias: hidrólise e síntese. As reações de síntese podem ainda se dividir em: esterificação, interesterificação, alcoólise e acidólise. As três últimas reações estão agrupadas em um termo único, a transesterificação. Esse termo é referente à troca de grupos entre dois ésteres (interesterificação), entre um éster e um álcool (alcoólise) e entre um éster e um ácido (acidólise) (Sharma e Kanwar, 2014). Assim, o percurso seguido por uma lipase dependerá do conteúdo aquoso do meio da reação, pois a ausência da água elimina a reação concorrente (Stergiou et al., 2013). Na Figura 1, estão representadas as reações catalisadas pela lipase.

### 1) Hidrólise (meio aquoso)



### 2) Esterificação (meio orgânico)



### 3) Transesterificação

#### a) Alcoólise



#### b) Acidólise



### 4) Interesterificação



Figura 1. Reações catalisadas pela enzima lipase. Fonte: Ghanem, (2007).

Diversos são os microrganismos capazes de sintetizar lipase como observado por Bharathi et al. (2018), que isolaram *Corynebacterium* sp., *Escherichia* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Klebsiella* sp. de solo derramado de gasolina. Também, foi constatado por De Moraes et al. (2016) a produção de lipases pelos fungos *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*. Outro fungo com potencial para aplicação industrial é o *Aspergillus* (Rakchai et al., 2016; Salihu et al., 2016; Sethi et al., 2016; Gricajeva et al., 2017) e o *Neosartorya fischeri* P1 (Sun et al., 2016).

Além desses, os microrganismos *Serratia marcescens* (Mohammadi et al., 2016), *Burkholderia* sp. (Liu et al., 2012), *Acinetobacter* sp. (Zheng et al., 2012), *Streptomyces* sp. (Praveen Kumar et al., 2017) e o gênero *Penicillium* (Li e Zong, 2010) têm sido empregados na produção de lipases.

### 3.4 Produção de lipases por microrganismos termofílicos

Os microrganismos possuem habilidade para adaptar-se em ambientes extremos, e o fator temperatura é o que mais influencia a função das biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas. Apesar de os microrganismos conhecidos e estudados crescerem em uma estreita faixa de temperatura, existem aqueles que não apenas resistem, mas também necessitam de altas temperaturas para sua sobrevivência, os chamados termofílicos (Gomes et al., 2007).

Os microrganismos termofílicos ou termófilos são aqueles que crescem bem a 45°C ou mais e possuem temperatura ótima de crescimento entre 55 e 65°C (Jay, 2005). Esse grupo é representado pelos procariotos dos Domínios Bacteria e Archaea e os eucariotos do Domínio Eukarya (fungos filamentosos) (Gomes et al., 2007). Esses microrganismos se adaptaram a condições ambientais extremas, o que os obrigou a desenvolver estratégias bioquímicas para conseguir a sobrevivência, como, por exemplo, a adaptação da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA às temperaturas acima da faixa mesofílica (Gomes et al., 2007). Ainda, os microrganismos termofílicos podem produzir enzimas com características termofílicas.

Lipases oriundas de microrganismos termofílicos têm sido cada vez mais empregadas na indústria devido às suas propriedades intrínsecas como alta estabilidade e atividade em temperaturas elevadas, bem como estabilidade a

agentes desnaturantes e variações de pH. Devido a isso, essas enzimas se tornam ideais para os processos industriais e químicos, pois o uso de temperaturas mais altas nesses processos evita a contaminação por microrganismos mesofílicos, além de reduzir a viscosidade e aumentar a solubilidade do composto (Egorova e Antranikian, 2005).

Diversos microrganismos termofílicos com potencial para produzir as enzimas lipases têm sido estudados atualmente. Koc e colaboradores (2015) mediram a atividade de 32 isolados termofílicos e 20 bacilos de referência. Foi detectada a produção de lipase por 11 termofílicos isolados e 7 bacilos referência, sendo que quando o azeite de oliva foi utilizado como substrato, observou-se que os isolados de *Geobacillus stearothermophilus* A113, *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. Calidus, e as referências de *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465T e *Geobacillus stearo-thermophilus* ATCC 7953T, destacaram-se na produção enzimática entre todas as bactérias utilizadas.

Burcu Bakir e Metin (2017) buscaram determinar as condições físico-químicas necessárias para produção de lipase e encontraram uma taxa de crescimento máxima e produção enzimática intracelular na temperatura de 50°C e pH 6,5, sendo que esta produção também ocorreu a 55°C e pH 9,5, pelo termofílico *Anoxybacillus* sp. HBB16.

Ainda, Saun e colaboradores (2014) isolaram uma bactéria termofílica produtora de lipase do solo de uma fonte termal identificada como *Bacillus aerius*. O pico da atividade da lipase foi observado quando o inóculo de 30 horas foi utilizado e incubado em agitação por 48 horas. A temperatura e o pH ideais para o crescimento bacteriano e a produção de lipases foram de 55°C e 8,0, respectivamente, com óleo de semente de algodão como fonte de carbono, extrato de levedura e extrato de carne como fonte de nitrogênio.

A origem do isolamento dos termófilos está diretamente relacionada com as suas características, visto que o ambiente seleciona a flora microbiana de acordo com as condições que os mesmos suportam, como demonstrado por Sharma et al. (2018). Nesse trabalho, os autores produziram lipase utilizando a bactéria *Bacillus thermoamylovorans* BHK67 isolada de uma fonte de água quente em Manikaran localizada no distrito de Kullu de Himachal Pradesh (India). A atividade enzimática máxima ocorreu em pH 7,5 e temperatura de 55°C com uma meia vida de

10h30min. A enzima produzida apresentou alta estabilidade ao etanol, n-propanol, iso-propanol e n-butanol.

Em outro trabalho, os pesquisadores Tayyab et al., (2011) isolaram um microrganismo termofílico do gênero *Geobacillus* de uma fonte termal localizada nas áreas do norte de Gilgit, no Paquistão, que produz lipases extracelulares com temperaturas de crescimento variando entre 45° e 75°C, e temperatura ótima de 60°C, apresentando também, amplo pH de atuação (6-12).

Além de fontes termais e solos com derramamento de lipídios, os alimentos ricos em gordura também são uma ótima fonte para obtenção de microrganismos lipolíticos, como demonstrado por Gricajeva et al. (2016). Também, diversos resíduos lipídicos agroindustriais são utilizados no isolamento. Pedroza-Padilla et al. (2017) coletando águas residuais contaminadas com gordura, obtiveram 149 isolados, dos quais 37 mostraram atividade lipolítica.

### 3.5 Aplicação industrial de lipases

As tecnologias que usam a catálise enzimática ganham cada vez mais atenção da academia científica e da indústria devido às inúmeras propriedades vantajosas que as enzimas possuem em relação aos catalisadores químicos. As lipases podem ser usadas em inúmeros setores e entre eles, a indústria de alimentos, química, farmacêutica, cosméticos, biodiesel, couro, entre outras.

Na indústria de alimentos, as lipases podem ser utilizadas como aditivos ou biocatalisadores na fabricação de ingredientes alimentares. Como aditivos estas enzimas são aplicadas para modificar o sabor através da síntese de ésteres de ácidos graxos e álcoois de cadeia curta, que são compostos conhecidos de sabor e fragrância. Como exemplos de aplicações pode-se citar os hidrolisados da gordura láctea, que têm sido aplicados em cereais, molhos, aperitivos e assados em geral, como a pipoca, resultando em produtos com melhor aroma e maior aceitabilidade pelos consumidores (Castro et al., 2004; Dekker e Daamen, 2011).

Ainda, no setor de lácteos, consegue-se o melhoramento das características sensoriais de queijos através do uso de lipases, como comprovado por Ozturkoglu-Budak e colaboradores (2016), que isolaram enzimas de um queijo artesanal, e dentre essas a lipase, relacionada à atividade das mesmas com a maturação do produto.

As lipases têm sido empregadas como melhoradores das características de pães por fortalecerem a estabilidade da massa, aumentar o volume, a textura e a vida útil dos mesmos (Stojceska e Ainsworth, 2008; Moayedallaie et al., 2010). Também como aditivos, as lipases provenientes do microrganismo *Lactobacillus plantarum* podem ser utilizadas na carne, com o objetivo de melhorar o aroma devido à síntese de ésteres de cadeia curta promovida pela enzima (Uppada et al., 2017).

Já na indústria de óleos e gorduras, as lipases podem ser utilizadas no processamento de óleos para se obter produtos com altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados com diferentes fontes de lipídios. Apesar de ser economicamente menos viável, a reação de hidrólise catalisada pela lipase, possibilita a obtenção de produtos específicos de alto valor agregado como o ácido 4-hidroxidecanoico usado como precursor de aromas, o éster  $\gamma$ -decalactona (sabor de frutas) e ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) do tipo ômega-3 e ômega-6, a partir da hidrólise de óleos marinhos por lipases não específicas (Castro et al., 2004).

Na indústria química, vários produtos são obtidos com uso de lipases em meio orgânico através da síntese de ésteres. A síntese de ésteres é considerada extremamente importante para a vida cotidiana, pois vários produtos de higiene, cosméticos e cremes, utilizam os ésteres de alto grau de pureza e qualidade, dentre eles, o isopropilmiristato, isopropilpalmitato e 2-etilexilpalmitato (Castro et al., 2004).

Ainda, as lipases são aplicadas na indústria de detergentes, sendo que esta é umas das principais utilidades dessas enzimas. Sharma et al. (2017) isolaram *Bacillus methylotrophicus* e nos estudos constataram que a estirpe é uma potencial produtora de lipase, e pode ser eficientemente utilizada em detergente para indústria.

### 3.6 Aproveitamento de resíduo e coprodutos agroindustriais na produção de enzimas

No Brasil, a produção de frutas chegou a 43,5 milhões de toneladas em 2017, no entanto, o país reúne atrativos e condições para produzir mais tendo em vista as características de clima e solo nas diferentes regiões nacionais que permitem a colheita quase o ano todo (Kist, 2018). O consumo desses geralmente

é feito de forma *in natura* ou através de produtos, tais como sucos, doces, geleias e compotas.

O processamento dos vegetais gera diversos resíduos e estes podem ser explorados na obtenção de produtos de valor agregado (coprodutos) devido à sua composição química (açúcares solúveis, fibras e outros materiais hidrolisáveis), eliminando o descarte e a quantidade de biomassa gerada no ambiente (Babbar e Oberoi, 2014).

Vários resíduos agroindustriais foram aproveitados por microrganismos em diferentes técnicas fermentativas devido à sua utilização como fontes de carbono e energia, produzindo enzimas industriais importantes, incluindo as lipases. Dentre eles, foram bem-sucedidos: o trigo, o milho, o arroz, a beterraba, os resíduos de banana, a batata, o chá, o coco, a maçã, as frutas cítricas, as farinhas de trigo, o bagaço de milho e o bagaço de cana-de-açúcar (Madeira et al., 2016).

A utilização de coprodutos e resíduos na produção de enzimas é uma ação economicamente viável e sustentável, pois essa atividade além de reduzir a quantidade de resíduo gerado na natureza, também reduz os custos para a produção final das enzimas. Os resíduos podem ser substratos de baixo custo para os microrganismos responsáveis pelo processo de fermentação, sendo reaproveitados na obtenção de novos produtos (Godoy et al., 2011). Dentre os coprodutos e resíduos que podem ser utilizados, destaca-se a farinha de laranja, farinha de uva, melaço da cana-de-açúcar e resíduo de óleo de cozinha industrial.

### 3.6.1 Farinha de Laranja

A laranja (*Citrus sinensis* L.) é a fruta da classe dos citrinos cultivada no mundo que possui maior importância comercial. Sua produção em 2018 foi de aproximadamente 17 milhões de toneladas, segundo o IBGE. Possui popularidade acentuada no mundo e é rica em substâncias essenciais na alimentação humana, tais como compostos bioativos (carotenoides e flavonoides), vitamina C, fibras e minerais (Niu et al., 2008). O seu consumo pode ser realizado na forma de suco ou *in natura*.

Segundo CITRUSB (2017), o Brasil é responsável por 34% da laranja e mais da metade do suco produzido em todo o mundo, participando com 76% no comércio mundial do suco, consolidando-se como o mais importante fornecedor



global deste nobre produto. A produção de suco de frutas cítricas, como a laranja, gera resíduos que constituem cerca de 45 a 60% da fruta (Fernández-Lopéz et al., 2009).

Os resíduos oriundos do processamento do suco de laranja possuem na sua constituição substâncias como pigmentos, açúcares, ácidos orgânicos, antioxidantes e fibras, sendo, portanto, possível sua aplicação em produtos geradores de bioprocessos com maior valor agregado (Okino-Delgado e Fleuri, et al., 2014). A utilização dos resíduos de laranja na produção de enzimas por microrganismos foi relatada em vários trabalhos (Marín et al., 2018; Ahmed et al. 2015; Sharma et al., 2016).

### 3.6.2 Farinha de Uva

As uvas (*Vitis vinífera* L.) são frutas amplamente cultivadas e consumidas em todo o mundo e possuem importância nutricional e bioativa. A baga da uva é composta de casca, polpa e sementes, e sua composição é altamente dependente da variedade, bem como dos fatores de cultivo, clima e processamento (Gomes et al., 2019).

O bagaço da uva é a principal fração dos resíduos sólidos gerados no processamento da uva, sendo até 60% do peso da uva que chega nas indústrias, sendo produzido após a prensagem das uvas, durante a produção de vinho branco, ou após a fase de maceração/fermentação alcoólica durante a produção de vinho tinto. Se esse bagaço for obtido do processo de vinificação, devido à fermentação, possuirá um conteúdo muito baixo de açúcares e em geral do conteúdo fenólico, porém, se o bagaço for proveniente do processamento para obtenção de sucos de uva ou vinhos brancos, o conteúdo desses compostos será maior (Spigno et al., 2017).

O uso do bagaço de uva como fonte de carbono para a produção de enzimas hidrolíticas por fermentação em estado sólido foi realizado por Teles e colaboradores (2018). Os autores utilizaram um coquetel de enzimas hidrolíticas produzido pela linhagem mutante *Aspergillus niger* 3T5B8 e ainda, extraíram compostos bioativos do bagaço de uva.

### 3.6.3 Melaço

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, tendo grande importância para o agronegócio brasileiro (Conab, 2018). O melaço é um subproduto da indústria açucareira, sendo produzido na proporção de 40 a 60 quilos por tonelada de cana processada (Embrapa., 2005), e obtido no estágio final da fabricação do açúcar cristalizado, do melado ou da refinação do açúcar.

Devido à sua composição química rica em açúcares, pode ser utilizado na obtenção do álcool, leveduras, fermentos e incorporado às rações de animais. Além disso, é rico em açúcares, e possui em menor quantidades nitrogênio, potássio e fósforo (Feltrin et al., 2000), constituindo uma boa fonte de carbono para o metabolismo celular. Também, o melaço da cana-de-açúcar é uma fonte de carbono com boa relação custo-benefício, e pode servir como nutriente para microrganismos produtores de enzimas industriais (He et al., 2014).

Bala e Singh (2015) produziram xilanase e três celulases, endo- $\beta$ -1,4-glucanase (CMCase), exo- $\beta$ -1,4-glucanase (FPase) e  $\beta$ -glicosidase (BGL) a partir de *Sporotrichum thermophile* e, quando utilizaram uma abordagem de otimização estatística, obtiveram uma produção quatro vezes melhor das enzimas. Singh e Satyanarayana (2008) utilizaram *Sporotrichum thermophile* para produzir fitase em meio de melaço de cana custo-efetivo em fermentação submersa e posteriormente aplicaram na produção de pães.

### 3.6.4 Óleo vegetal residual de fritura

Os óleos vegetais são substâncias hidrofóbicas, extraídos de plantas, e constituídos predominantemente por ésteres de triacilgliceróis, produtos resultantes da esterificação entre o glicerol e ácidos graxos. O óleo de soja, um dos principais óleos vegetais processados na indústria alimentícia, é rico em ácido linoleico (ômega 6), além de ácido oleico (ômega 9) e ácido linolênico (ômega 3) e possui cor levemente amarelada, límpida, com odor e sabor suave característico (Food Ingredients Brasil, 2014).

Segundo a ABIOVE, foram consumidas 436 mil toneladas de óleo de soja no Brasil em 2018, sendo utilizado na fritura de diversos alimentos e após o processo, se torna um resíduo sólido urbano e industrial. Se descartado de forma

inapropriada no ambiente, pode contaminar os rios e lençóis freáticos, porém, o seu resíduo pode retornar à cadeia produtiva como matéria-prima para diversos produtos como: tinta, sabão, massa de vidraceiro, ração para animais, energia elétrica, formulação de tinta de impressão e, dentre outros, também na produção do biodiesel (Suarez e Mello, 2011).

Na obtenção de enzimas, tais como lipases, pode-se empregar diversos resíduos oleaginosos, como feito por Penha e colaboradores (2016), que avaliaram o desempenho de linhagens de *Aspergillus niger* (mutante e selvagem) na produção de lipases utilizando meios de cultivo formulados a partir da torta de dendê (palmiste) e da borra alcalina do refino do óleo de dendê (borra de dendê), ambos resíduos provenientes da agroindústria do óleo de dendê (palma). Demonstrou-se também, que as tortas de babaçu (*Orbygnia phalerata*), canola (*Brassica napus*), sementes de mamona (*Ricinus communis*) e girassol (*Helianthus annuus*), resíduos oriundos dos processos de extração de óleos de sementes, grãos e frutos, apresentam grande potencial para a produção de enzimas (Castro et al., 2011).

### 3.7 Planejamento experimental

O planejamento de experimentos é definido como a coleta de dados experimentais de forma planejada para se atingir determinados objetivos. Através do planejamento experimental é possível estudar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência, podendo ser instigadas em cada tentativa, todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável (Barros Neto et al., 1996).

Para Rodrigues e Lema (2009), o planejamento consciente dos experimentos que devem ser realizados para determinar e quantificar a influência das variáveis sobre respostas desejadas, é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos e para que análises estatísticas consistentes sejam realizadas.

A metodologia do planejamento experimental, associada à análise de superfície de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (Box et al., 1978 apud Rodrigues e Lema, 2009).

A metodologia de superfície de resposta é uma técnica estatística aplicável ao planejamento experimental bastante vantajosa em relação aos métodos convencionais disponíveis, incluindo um número reduzido de experimentos e a busca da interação entre os fatores que possibilitam a construção de modelos, avaliação dos efeitos dos fatores e obtenção das condições ótimas para respostas desejáveis (Shukla et al., 2007). Vários trabalhos utilizando DCCR e a metodologia de superfície de resposta para produção de compostos de interesse biotecnológico, têm sido relatados na literatura (Paludo et al., 2018; Kalishwaralal et al., 2010)

Kiran et al. (2016) otimizaram o meio para a produção de protease fibrinolítica por *Proteus penneri* SP-20 utilizando a ferramenta estatística de DCCR associada à metodologia de superfície de resposta, obtiveram um notável aumento na produção do composto de interesse. Após a otimização, os autores sugeriram que o meio otimizado poderia ser utilizado na produção em escala industrial.

Jung et al. (2015) estudaram a composição do meio para produção de celulasas por *Penicillium brasilianum* KUEB15 utilizando palha de milho. Ao utilizar a ferramenta estatística DCCR, os pesquisadores conseguiram otimizar o meio obtendo uma atividade de  $1,18 \text{ U.mL}^{-1}$  de celulase, valor superior ao encontrado anteriormente ao uso do planejamento.

Na otimização da produção de lipase, vários fatores podem ser estudados, tais como: fonte de carbono, fonte de nitrogênio, concentração da fonte de nitrogênio, indutor, concentração do indutor, cepa fúngica, pH e agitação, como demonstrado por Colla et al. (2016), que utilizaram um Planejamento Fatorial Completo  $2^3$  associado à metodologia de superfície de resposta e obtiveram as melhores condições de produção da enzima por fungos filamentosos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Microrganismo

A estirpe utilizada neste estudo é uma bactéria termofílica proveniente de uma região de derramamento de óleo diesel localizada em uma área de aproximadamente 800 m<sup>2</sup> às margens da BR-101, no Km 88, latitude 21°49'16.7"S longitude 41°28'30.9"W, em Ibitioca, Campos dos Goytacazes – RJ. O solo foi coletado e fornecido por Tellechea (2015) e a estirpe foi isolada pelo setor de Microbiologia Industrial e de Alimentos pertencente ao laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), localizado em Campos dos Goytacazes, RJ. A estirpe isolada foi identificada como *Bacillus licheniformis* pela Coleção de Cultura tropical – Fundação André Tosello, Campinas - SP.

A bactéria foi mantida sob temperatura de refrigeração (7°C) em placas de Petri contendo meio de cultura composto por: óleo de soja (5 g.L<sup>-1</sup>), ágar (20 g.L<sup>-1</sup>), NaCl (10 g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (10 g.L<sup>-1</sup>), água de maceração de milho (20 g.L<sup>-1</sup>) e água destilada (1 L). Após o preparo do meio, este foi esterilizado em autoclave por 121°C, por 15 minutos e posteriormente utilizado para a manutenção do microrganismo de interesse.

#### 4.1.2 Meio de cultura

Para a produção de lipases, foi utilizado o meio de cultura fixo composto por: KCl ( $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ );  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $0,87 \text{ g.L}^{-1}$ );  $\text{MgSO}_4$  ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ); NaCl ( $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ ); traços de metais ( $0,001\text{L}$ :  $\text{CaCl}_2$ ,  $2,2 \times 10^{-3}$ ; ZnO,  $2,5 \times 10^{-3}$ ;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $2,7 \times 10^{-2}$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $1,0 \times 10^{-2}$ ;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $8,5 \times 10^{-4}$ ;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $2,4 \times 10^{-3}$ ,  $\text{NiCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $2,5 \times 10^{-4}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $3,0 \times 10^{-4}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ,  $1,0 \times 10^{-3}$ ) e água (1L). As fontes de carbono Farinha de Laranja (FL), Farinha de Uva (FU), Melaço (MEL) e o Resíduo de óleo de cozinha industrial (ROI) foram adicionadas em diferentes concentrações para obtenção de um meio de cultura com alta produtividade da enzima de interesse. As farinhas e o melaço foram obtidos da empresa Relva verde®, e o óleo de fritura (soja), do restaurante universitário da UENF, Campos dos Goytacazes, RJ. A caracterização físico-química das farinhas de uva e laranja, bem como do melaço, foi fornecida pela empresa Relva Verde® (Tabela 2), e a caracterização do óleo de resíduo industrial foi realizada pelo setor de Química de Alimentos no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Tabela 2. Composição físico-química das farinhas de laranja, uva e do melaço

	Farinha de laranja (50 g)	Farinha de uva (50 g)	Melaço (50 g)
Valor energético	117,5 kcal/495kJ	180 kcal/454kJ	250 kcal/420 kj
Carboidrato	23 g	43,3 g	62,5 g
Proteína	3 g	1,8 g	0 g
Gordura total	1,5 g	0 g	0 g
Gordura saturada	0 g	0 g	0 g
Gordura Trans	0 g	0 g	0 g
Fibra	17 g	2,7 g	0 g
Sódio	0,9 g	0 g	0,5 g

Tabela 3. Qualidade físico-química do resíduo de óleo de cozinha industrial

Análises do óleo		Padrão IN N° 49, de 22 de dezembro de 2006 (Brasil, 2006)
Acidez*	2,54 mgKOH.g <sup>-1</sup>	0,20 mgKOH.g <sup>-1</sup>
Índice de peróxidos**	2 mEq.kg <sup>-1</sup>	2,5 mEq.kg <sup>-1</sup>
Índice de lodo ***	111,88 gl/100g	124 gl/100g

\*acidez expressa como % (g/100) de ácido oleico.

\*\*Índice de peróxidos em meq por 1000g da amostra.

\*\*\*Índice de lodo em g de lodo adsorvido/ 100 gramas de gordura.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Preparo do meio de cultura para produção de lipase

O meio utilizado para a produção de lipases foi preparado em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, adicionando-se as fontes de carbono FL, FU, MEL e o ROI, nas concentrações estudadas ao meio fixo descrito no item 4.1.2. O pH final do meio foi ajustado em 7,5 com NaOH 1,0 M. Posteriormente o meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

### 4.2.2 Crescimento da bactéria e preparo do inóculo

A bactéria *Bacillus licheniformis* foi estriada em placas de petri contendo o meio com óleo de soja da marca Liza® (5 g.L<sup>-1</sup>), ágar (20 g.L<sup>-1</sup>), NaCl (10 g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (10 g.L<sup>-1</sup>), água de maceração de milho (20 g.L<sup>-1</sup>) e água destilada (1 L), previamente esterilizado em autoclave por 121°C por 15 minutos com pH ajustado em 7,5. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa QUIMIS (modelo Q 315 D26) a 50°C por 18 horas.

Após o tempo de crescimento, 5 mL do pré-inóculo anteriormente preparado conforme o item 4.2.1 contendo 0,5% (m/v) da fonte de carbono (FL ou FU ou MEL) variando de 0,15 a 1% (m/v) e 0,5% do ROI, foram transferidos para a placa com o objetivo de ressuspender as células e posteriormente foram sugadas com o auxílio de uma pipeta estéril. Em seguida, estas células foram inoculadas em

outro frasco de Erlenmeyers de 250 mL contendo o meio de crescimento esterilizado. Posteriormente, os frascos foram incubados a 50°C por 18 horas em um “shaker” rotatório (Thermo forma Orbital Shaker, Ohio, USA) operando a 150 rpm, conforme Silva (2006).

#### 4.2.3 Influência da aplicação das farinhas de laranja, uva, melão e resíduo de óleo de cozinha industrial para produção de lipases

As fontes de carbono FL, FU, MEL foram testadas em diferentes concentrações com o ROI na concentração 0,5% (m/v) conforme a Tabela 4. Para tanto, os mesmos foram pesados individualmente em frascos de Erlenmeyers de 250 mL e 50 mL do meio fixo líquido (item 4.1.2) foi adicionado ao mesmo, sendo previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. O inóculo de *Bacillus licheniformis* foi preparado segundo o item 4.2.2 e posteriormente, 3 mL deste foram transferidos para os frascos contendo o meio de cultura estéril. Um meio de controle de glicose com 0,5% (m/v) fixo, foi utilizado. Após 36h de incubação em agitador orbital (150 rpm) a 50°C, obteve-se o extrato enzimático para análises posteriores. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Um Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade foi utilizado e a fonte de carbono que apresentou melhor resultado quanto à produção de lipase pelo *Bacillus licheniformis* foi estudada através do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR).

Tabela 4. Concentrações das fontes de carbono que foram estudadas

Tratamentos	Concentração da FC % (m/v)
1	0,15
2	0,25
3	0,50
4	0,75
5	1,00
Controle	0,50

FC: Fonte de carbono (Farinha de laranja – FL; Farinha de uva – FU; Melão – MEL).



#### 4.2.4 Planejamento experimental do tipo DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional

4.2.4.1 Otimização do meio para produção de lipases utilizando DCCR - Efeito da farinha de laranja (FL), resíduo de óleo de cozinha industrial (ROI) e do tempo do processo fermentativo

A otimização foi realizada seguindo um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2<sup>3</sup>, com seis pontos axiais, três repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios (Rodrigues e Lemma, 2009). As variáveis independentes estudadas foram FL, ROI e tempo do processo fermentativo.

Para o estudo do efeito da FL, ROI e o tempo de fermentação na produção da enzima de interesse, preparou-se 50 mL de meio de cultura fixo conforme item 4.1.2 e este foi adicionado de FL e ROI conforme a Tabela 5 em frascos de Erlenmeyers de 250 mL. Ajustou-se o pH final para 7,5 e esterilizou-se em autoclave a 121°C por 15 minutos. Posteriormente, inoculou-se o meio com 4 mL do inóculo preparado segundo o item 4.2.2 partindo de uma densidade ótica de 0,1 medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm (SHIMADZU UV-mini 1240). Posteriormente, incubou-se os frascos a 50 °C em agitador orbital (Thermo Forma, Ohio, EUA) a 150 rpm.

Tabela 5. Delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2<sup>3</sup> com os níveis das variáveis independentes: Farinha de laranja (FL), Resíduo de óleo de cozinha industrial (ROI) e tempo de fermentação

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
X <sup>1</sup> FL (% m/v)	0	0,2	0,5	0,8	1
X <sup>2</sup> ROI (% m/v)	0,1	0,28	0,55	0,82	1
X <sup>3</sup> Tempo (h)	10	23	42	61	74

#### 4.2.4.2 Estudo das condições de produção de lipase utilizando o DCCR - Efeito do pH e temperatura do processo fermentativo

O efeito do pH e da temperatura (°C) foi estudado após a obtenção das melhores condições do meio de cultura que proporcionam elevada produção de lipases pelo *Bacillus licheniformis*, conforme o item 4.2.4.1.

O estudo foi realizado seguindo um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2<sup>2</sup>, incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central (Rodrigues e Lemma, 2009) em relação às variáveis independentes: pH e temperatura do processo fermentativo. Os níveis das variáveis foram definidos a partir de testes preliminares e estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6. Delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2<sup>2</sup> com os níveis das variáveis independentes: pH e temperatura, para a produção de lipase

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
<sup>X1</sup> Temperatura (°C)	30	33,6	42,5	51,4	55
<sup>X2</sup> pH	5,5	6,0	7,2	8,5	9,0

#### 4.2.5 Determinação do pH

O pH do meio de cultura foi medido através da inserção do eletrodo do pHmetro no meio com um medidor de pH de bancada da marca MS TECNOPON mPA210.

#### 4.2.6 Obtenção do extrato enzimático

O extrato enzimático foi obtido através da coleta de amostras do meio de cultura após a finalização do processo fermentativo. Para tanto, 30 mL do meio de cultura foram centrifugados em centrífuga (HERMLEZ 382K, Wehingen,

Alemanha), a 4500 rpm por 30 minutos a 4°C para obtenção do sobrenadante livre de células e resíduos, conforme Costa (2017).

#### 4.2.7 Atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada seguindo a metodologia proposta por (Guo, Chen, Wang, & Huang, 2015) com algumas modificações. O método baseia-se na hidrólise do substrato p-nitrofenilbutirato (pNPB) para o p-nitrofenol cuja liberação promove um aumento na absorbância em 410 nm, como pode ser observado na Figura 2 (Zaid et al., 2015).

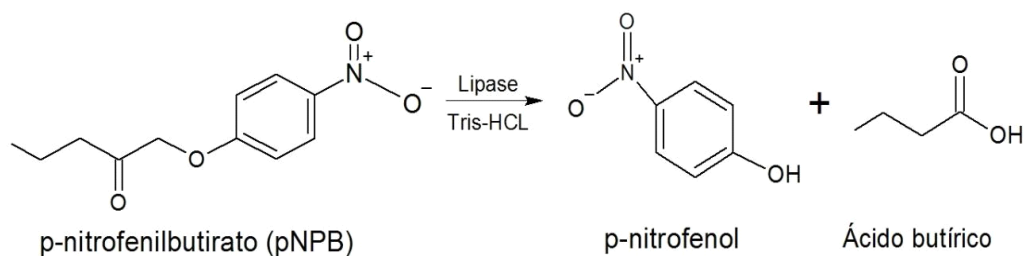


Figura 2. Hidrólise do p-nitrofenilbutirato por lipase (Zaid et al., 2015).

Para isso, preparou-se as soluções de p - nitrofenilbutirato 0,01 M em etanol, tampão Tris-HCl (pH 8,5) e carbonato de sódio 0,1 M. A reação foi realizada no tubo de ensaio e consistiu em adicionar 50 µL da solução p - nitrofenilbutirato em 850 µL de tampão Tris-HCl e posteriormente, acrescentar 100 µL do extrato enzimático. Agitou-se os tubos no equipamento vortex e incubou-se por 2 minutos em banho-maria a 70°C. A reação foi paralisada com 250 µL de carbonato de sódio em banho de gelo. Agitou-se e realizou-se a leitura a 410 nm em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-mini 1240). Para o branco da reação, o mesmo procedimento foi realizado, porém, sem o extrato enzimático. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação

de 1  $\mu$ mol de pNP (*p*-nitrofenilato) por minuto nas condições da reação. A atividade lipolítica foi calculada de acordo com a EQUAÇÃO 1:

$$\text{Atividade lipolítica (U. mL)} = \frac{(\text{Abs}_A - \text{Abs}_B) \times VT}{\xi \times VE \times t} \quad 1)$$

Onde:

$\text{Abs}_A - \text{Abs}_B$  = diferença entre absorvância da amostra e a absorvância do branco;

VT (mL) = volume total da reação;

$\xi$  (mL/(cm.micromol)) = 14,3 (coeficiente de extinção molar);

VE = volume do extrato enzimático;

t = tempo da reação.

4.2.8 Avaliação da presença das enzimas protease, avicelase, carboximetilcelulase, amilase, xilanase e lipase no meio otimizado

Após a obtenção das melhores condições do meio para a produção de lipases, realizaram análises para a detecção da presença das enzimas protease, avicelase, carboximetilcelulase, amilase, xilanase e lipase.

#### 4.2.8.1 Protease

A atividade da protease foi verificada através da quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) 15% (Johnvesly e Naik, 2001). Para tanto, utilizou-se como substrato uma solução de azocaseína 0,2% (p/v) preparada em tampão Tris HCl (0,05 M, pH 8,5). A reação enzimática foi realizada adicionando o extrato enzimático ao substrato sob incubação em banho-maria a 70°C por 10 minutos. Paralisou-se a reação pela adição de TCA e centrifugou-se (15.000g, 5 minutos, 4°C) em centrífuga Hermele Z 382K. O sobrenadante foi colocado em tubos de ensaio contendo uma solução de NaOH (1 N). O branco foi realizado seguindo o mesmo procedimento para as amostras, porém o TCA foi adicionado

antes do extrato enzimático. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorvância a 420 nm igual a 0,1 em 60 minutos. A atividade da protease foi calculada conforme a EQUAÇÃO 2.

$$Protease(U.mL): (Abs_A - Abs_B) * 60 * \left(\frac{t}{t_i}\right) * \left(\frac{V_t}{V_e}\right)$$

Onde:

$Abs_A - Abs_B$ = diferença entre absorvância da amostra e a absorvância do branco;

60= tempo em minutos para uma hora de reação;

t= tempo da reação por minuto;

$t_i$ = tempo de incubação;

$V_t$ = volume total da reação;

$V_e$ = volume do extrato enzimático.

#### 4.2.8.2 Avicelase (Exo- $\beta$ -1, 4- Glucanase) e Carboximetilcelulase ( $\beta$ -1, 4-endoglicanase)

As atividades das enzimas Avicelase e Carboximetilcelulase foram determinadas segundo Ghose (1987). A reação foi realizada adicionando 0,5 mL do extrato bruto enzimático em um tubo contendo 0,5 mL de solução de substrato (avicel; carboximetilcelulose) a 1% em tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0). Incubou-se a 70°C por 10 minutos e, após o tempo de reação, adicionou-se 1 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) ao tubo. A mistura foi colocada em ebulição por 10 minutos e, posteriormente em banho de gelo durante 5 minutos, e a absorvância foi medida utilizando espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, a 540 nm. O branco foi realizado seguindo o mesmo procedimento para as amostras, porém o extrato enzimático não foi adicionado, substituindo o mesmo pelo tampão acima citado. Uma unidade de atividade da enzima foi definida como 1  $\mu$ mol de açúcar redutor oriundo da hidrólise de carboximetilcelulose ou de avicel liberado por

minuto, utilizando uma curva padrão de glicose nas concentrações de 0,014 a 0,30 mg/mL, nas condições do ensaio acima descrito. A atividade da avicelase e carboximetilcelulase foi calculada conforme a EQUAÇÃO 3.

$$\text{Avicelase ou Carboximetilcelulase (U.mL)}: \left( \frac{(\text{AbsA} - \text{AbsB}) + 0,064}{0,7904} \right) * \left( \frac{t}{t_i} \right) * \left( \frac{V_t}{V_e} \right)$$

Onde:

$\text{Abs}_A - \text{Abs}_B$  = diferença entre absorvância da amostra e a absorvância do branco;

t = tempo da reação por minuto;

$t_i$  = tempo de incubação;

$V_t$  = volume total da reação;

$V_e$  = volume do extrato enzimático.

#### 4.2.8.3 $\alpha$ -amilase

A atividade da  $\alpha$ -amilase foi determinada segundo a metodologia descrita por (Miller, 1959). Para realizar a reação, 0,5 mL do extrato enzimático foi adicionado no tubo contendo 1,0 mL da solução de amido em 1,0% preparada em tampão Tris-HCl (0,05 M e pH 8,0) com 0,5 mL do tampão. Incubou-se a mistura em banho-maria por 10 minutos a 90°C. Posteriormente, paralisou-se a reação pela adição de 1 mL da solução de DNS à mistura. A mistura foi colocada em ebulição por 10 minutos e, posteriormente em banho de gelo durante 5 minutos. Por fim, a coloração desenvolvida no tubo foi medida utilizando espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, a 540 nm. O branco foi realizado seguindo o mesmo procedimento para as amostras, porém no tubo foi adicionado 1,0 mL do tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,0) substituindo o extrato enzimático. Uma unidade de amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de açúcares redutores por minuto por mL da enzima a partir do amido solúvel, mas usando uma curva padrão de glicose nas concentrações 0,014 a 0,30 mg/mL, nas

condições do ensaio acima descrito. A atividade da amilase foi calculada conforme a EQUAÇÃO 4.

$$\text{Amilase (U.mL)}: \left( \frac{(\text{AbsA} - \text{AbsB}) + 0,064}{0,7904} \right) * \left( \frac{t}{t_i} \right) * \left( \frac{V_t}{V_e} \right)$$

Onde:

$\text{Abs}_A - \text{Abs}_B$  = diferença entre absorvância da amostra e a absorvância do branco;

t= tempo da reação por minuto;

$t_i$ = tempo de incubação;

$V_t$ = volume total da reação;

$V_e$ = volume do extrato enzimático.

#### 4.2.8.4 Xilanase (endo-1,4- $\beta$ -xilanase)

A atividade da enzima xilanase foi determinada segundo Miller (1959). Para realizar a reação enzimática, adicionou-se 0,5 mL do extrato enzimático, 1 mL de solução de xilana a 1,0% (p/v) em tampão Tris-HCl (0,05 M e pH 8,0) e 0,5 mL do tampão. Em seguida, incubou-se a mistura em banho-maria durante 30 minutos na temperatura de 70°C. Posteriormente, paralisou-se a reação adicionando 1,0 mL de ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS) à mistura. A mistura foi colocada em água fervente por 10 minutos e resfriada em banho de gelo por 5 minutos. A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, com comprimento de onda a 540 nm. O branco foi realizado seguindo o mesmo procedimento para amostra, porém no tubo foi adicionado 1,0 mL do tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,0) substituindo o extrato enzimático. Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de xilose por minuto por mL usando uma curva padrão de xilose nas concentrações de 0,1 a 1,0 mg/mL, nas condições do ensaio acima descrito. A atividade da xilanase foi calculada conforme a EQUAÇÃO 5.

$$Xilanase (U.mL): \left( \frac{(AbsA - AbsB) + 0,0258}{0,0684} \right) * \left( \frac{t}{ti} \right) * \left( \frac{Vt}{Ve} \right)$$

Onde:

Abs<sub>A</sub> – Abs<sub>B</sub>= diferença entre absorvância da amostra e a absorvância do branco;

t= tempo da reação por minuto;

t<sub>i</sub>= tempo de incubação;

V<sub>t</sub>= volume total da reação;

V<sub>e</sub>= volume do extrato enzimático.

#### 4.2.9 Análise estatística

Os resultados do teste de média foram submetidos ao teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade conforme o item 4.2.3. Para os resultados do planejamento experimental do tipo DCCR 2<sup>2</sup> e 2<sup>3</sup> (item 4.5), utilizou-se a análise de variância pelo teste F. Quando possível, modelos de superfície de resposta foram gerados. O programa utilizado para geração dos dados foi Statistica versão 7.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo da influência da aplicação das farinhas de laranja, uva, melaço e resíduo de óleo de cozinha industrial para produção de lipases

Os resultados obtidos após o estudo da utilização da farinha de laranja, uva e melaço como fonte de carbono em diferentes concentrações por *Bacillus licheniformis* para produção de lipase e ROI fixo em 0,55 (% m/v), conforme item 4.4, estão expressos na Tabela 7.

Tabela 7. Atividade da lipase com o meio contendo FL, FU e MEL em diferentes concentrações

Fonte de carbono (% m/v)	Atividade lipolítica para FL (U.mL <sup>-1</sup> )	Atividade lipolítica para FU (U.mL <sup>-1</sup> )	Atividade lipolítica para MEL (U.mL <sup>-1</sup> )
0,15	4,72x10 <sup>-2a</sup>	7,80x10 <sup>-2a</sup>	15,7x10 <sup>-2a</sup>
0,25	2,64x10 <sup>-2a</sup>	7,21x10 <sup>-2a</sup>	5,33x10 <sup>-2a</sup>
0,50	34,8x10 <sup>-2bc</sup>	7,45x10 <sup>-2a</sup>	6,69x10 <sup>-2a</sup>
0,75	13,0x10 <sup>-2a</sup>	17,3x10 <sup>-2b</sup>	10,7x10 <sup>-2a</sup>
1,00	1,31x10 <sup>-2a</sup>	13,1x10 <sup>-2ab</sup>	12,7x10 <sup>-2a</sup>
Controle	30,5x10 <sup>-2c</sup>	30,5x10 <sup>-2c</sup>	30,5x10 <sup>-2b</sup>

Médias seguidas por uma mesma letra não diferenciam entre si pelo Teste de Tukey em 5% de probabilidade.

As fontes FL, FU e MEL ao serem combinadas com ROI possibilitaram a produção de lipase por *Bacillus licheniformis* em todos os tratamentos estudados. Observa-se que o meio controle (com glicose) apresentou a maior atividade lipolítica quando comparado a todas as fontes de carbonos estudadas em diferentes concentrações, exceto para o tratamento com concentração 0,50 (% m/v) de FL que foi estatisticamente semelhante ao valor obtido com o meio controle,  $34,8 \times 10^{-2}$  e  $30,5 \times 10^{-2}$  U.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A glicose é uma fonte de carbono pura e de fácil assimilação metabólica pelo microrganismo quando utilizada em baixas concentrações para produção de lipase, e, devido a isso, a atividade enzimática da lipase por *Bacillus licheniformis* produzida no meio contendo essa fonte de carbono é superior aos valores obtidos com resíduos e coprodutos. No entanto, devido ao alto custo dessa fonte, é necessário encontrar meios que possibilitem a produção da enzima em quantidades iguais ou superiores a um baixo custo.

Conforme a composição das fontes de carbono apresentada na Tabela 2, a farinha de laranja foi o único coproduto que apresentou um conteúdo de lipídios e este fato pode ter contribuído para seu destaque no valor de atividade lipolítica produzida por *Bacillus licheniformis* quando utilizada na concentração mencionada anteriormente. Todavia, com o aumento da concentração de farinha, observou-se um declínio na atividade, e este fato pode ser explicado pela presença da pectina em maior volume, que segundo Kumar e Chauhan (2010), pode atuar como inibidor enzimático lipolítico.

A produção de lipase utilizando resíduos de laranja romã e abacaxi foi relatada por Selvakumar e Sivashanmugam (2017). Os autores obtiveram a atividade máxima de lipase de 57,63 U.mL<sup>-1</sup>, quando combinaram os resíduos e trataram com ultrassom durante 15 minutos antes de iniciar o processo de fermentação em pH 6, temperatura de 33 ° C, e agitação de 210 rpm durante 4 dias, valor superior ao encontrado na presente pesquisa. Conforme observado pelos autores, o tratamento de resíduos antes do processo de fermentação é uma alternativa para aumentar a atividade enzimática, pois, esse provoca a desintegração da estrutura biológica dos compostos facilitando a degradação pelo microrganismo. O método utilizado pelos autores pode ser realizado em trabalhos posteriores. Também, a atividade lipolítica pode variar de acordo com o substrato utilizado para medi-la, e no caso do presente trabalho, o substrato *p*-nitrofenil

butirato é mais instável devido à sua cadeia menor em relação ao substrato utilizado pelos autores, o que pode ter possibilitado uma atividade maior (Farnet et al., 2010).

Para a farinha de uva, as concentrações 0,75 e 1 (% m/v) forneceram os maiores valores de atividade enzimática,  $1,73 \times 10^{-1}$  e  $1,31 \times 10^{-1}$  U.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Os resíduos de uva têm sido utilizados como substratos para produção de diversas enzimas, tais como pectinases (Venkatesh et al., 2009), Tanase (Paranthaman et al. 2009), carboximetilcelulases e tanases (Teles et al., 2018), mas não foram encontrados relatos sobre sua utilização na produção de lipase por processos fermentativos na literatura. Apesar de apresentarem atividade enzimática, ainda são necessários mais estudos para encontrar a máxima produtividade.

O experimento contendo MEL como fonte de carbono em diferentes concentrações produziu atividades lipolíticas em torno de  $5,33 \times 10^{-2}$  a  $1,57 \times 10^{-1}$  U.mL<sup>-1</sup>, não diferindo estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. A atividade da enzima produzida por *Bacillus licheniformis* utilizando essa fonte pode ter sido menor que o meio controle devido à complexidade do principal carboidrato presente no MEL, a sacarose, que necessita ser degradada em glicose e frutose para ser assimilada pelo microrganismo, necessitando de um tempo maior de fermentação. O melaço como fonte de carbono foi testado para produção de lipases por Naqvi et al. (2012) e por Cavalcanti e colaboradores (2005). Ambos estudaram concentrações de MEL e tempos elevados em relação ao estudado na presente pesquisa e encontraram valores de atividade lipolítica superiores aos resultados achados. No primeiro estudo, algumas espécies de fungos, como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* e *Mucor geophilus* cresceram em 2,5% e 5% de melaço, e a espécie *Mucor geophilus* se destacou produzindo 44,5 U.mL<sup>-1</sup> com 5% de melaço durante 72h de fermentação. No segundo, a torta de babaçu foi combinada com melaço (6,25%) utilizando *Penicillium simplicissimum* em fermentação em estado sólido e estudaram a influência da temperatura e da vazão de ar, e após 72h de cultivo, obtiveram a atividade máxima de 26,4 U.g<sup>-1</sup> na temperatura de 27 °C e fluxo de ar de 0,8 L.min<sup>-1</sup>.

Considerando os resultados obtidos nesta etapa da pesquisa, a farinha de laranja foi selecionada para a continuidade dos estudos da produção de lipases por

*Bacillus licheniformis* isolado de solo oriundo de uma região de derramamento de óleo diesel.

5.2 Otimização do meio para produção de lipases utilizando DCCR - Efeito da farinha de laranja (FL), resíduo de óleo de cozinha industrial (ROI) e do tempo do processo fermentativo

O efeito das variáveis independentes FL, ROI e tempo e suas interações sobre a produção de lipases foi estudado através do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) do tipo  $2^3$ , contendo 3 pontos centrais e 6 pontos axiais, totalizando 17 tratamentos diferentes. Uma região ótima foi determinada após a análise dos dados utilizando análise de variância (ANOVA). Posteriormente, um teste F foi aplicado e superfície de resposta foi construída quando possível. A matriz do DCCR do tipo  $2^3$  para as respostas atividade lipolítica e pH, está apresentada na tabela 8.

Tabela 8. Matriz do DCCR 2<sup>3</sup> com os valores codificados e os valores reais das variáveis independentes estudadas

Ensaio	FL (% m/V)	ROI (% m/V)	Tempo (horas)	Atividade	
				lipolítica (U.mL <sup>-1</sup> ) 1)	pH
1	(-1) 0,20	(-1) 0,28	(-1) 23	2,53 x10 <sup>-1</sup>	7,89
2	(+1) 0,80	(-1) 0,28	(-1) 23	1,46 x10 <sup>-1</sup>	8,00
3	(-1) 0,20	(+1) 0,82	(-1) 23	2,68 x10 <sup>-1</sup>	7,79
4	(+1) 0,80	(+1) 0,82	(-1) 23	1,19 x10 <sup>-1</sup>	8,20
5	(-1) 0,20	(-1) 0,28	(+1) 61	2,43 x10 <sup>-1</sup>	8,81
6	(+1) 0,80	(-1) 0,28	(+1) 61	2,97 x10 <sup>-1</sup>	9,04
7	(-1) 0,20	(+1) 0,82	(+1) 61	1,73 x10 <sup>-1</sup>	8,82
8	(+1) 0,80	(+1) 0,82	(+1) 61	4,44 x10 <sup>-1</sup>	9,17
9	(-1,68) 0	(0) 0,55	(0) 42	1,84 x10 <sup>-1</sup>	8,31
10	(+1,68) 1,0	(0) 0,55	(0) 42	3,06 x10 <sup>-1</sup>	8,33
11	(0) 0,5	(-1,68) 0,10	(0) 42	2,52 x10 <sup>-1</sup>	8,13
12	(0) 0,5	(+1,68) 1,0	(0) 42	2,61 x10 <sup>-1</sup>	7,46
13	(0) 0,5	(0) 0,55	(-1,68) 10	2,06 x10 <sup>-1</sup>	6,89
14	(0) 0,5	(0) 0,55	(+1,68) 74	4,10 x10 <sup>-1</sup>	9,03
15	(0) 0,5	(0) 0,55	(0) 42	3,49 x10 <sup>-1</sup>	8,07
16	(0) 0,5	(0) 0,55	(0) 42	3,34 x10 <sup>-1</sup>	7,98
17	(0) 0,5	(0) 0,55	(0) 42	3,13 x10 <sup>-1</sup>	8,11

Conforme apresentado, os resultados de atividade lipolítica variaram de 1,19 x10<sup>-1</sup> a 4,44 x10<sup>-1</sup> U.mL<sup>-1</sup>, nos ensaios 4 e 8, respectivamente, e os valores de pH, de 7,4 a 9,17, nos ensaios 12 e 8, respectivamente.

Após a análise de variância - ANOVA (Tabela 9) para a resposta atividade lipolítica, observou-se que o modelo ajustado foi significativo pelo teste F (p<0,05), apresentando porcentagem de variação explicada (R<sup>2</sup>) de 88,78%.

Tabela 9. Análise de variância realizada para a resposta atividade lipolítica por *Bacillus licheniformis* no meio contendo FL e ROI com tempo de fermentação variável

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	F crítico
Regressão	0,119	9	0,013	6,599	3,68
Resíduo	0,014	7	0,002		
Falta de Ajuste	0,013	5	0,002	8,063	19,30
Erro Puro	0,000	2	0,000		
Total	0,147	23			

Os coeficientes de regressão e p-valor para as medidas da atividade lipolítica estão dispostos na Tabela 10. Observa-se que os parâmetros significativos foram os termos quadráticos para a concentração da FL e para o ROI, o termo linear para o tempo estudado, bem como para a interação entre a farinha de laranja e o tempo em 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

Tabela 10. Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo matemático para atividade lipolítica conforme o DCCR

Fatores	Coef. de Regressão	p- valor
Média	0,334	<b>0,000</b>
X <sub>1</sub>	0,020	0,142
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-0,036	<b>0,031</b>
X <sub>2</sub>	0,006	0,644
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-0,032	<b>0,048</b>
X <sub>3</sub>	0,052	<b>0,003</b>
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	-0,014	0,344
X <sub>1</sub> * X <sub>2</sub>	0,022	0,206
X <sub>1</sub> * X <sub>3</sub>	0,073	<b>0,002</b>
X <sub>2</sub> * X <sub>3</sub>	0,011	0,507

X<sub>1</sub>: Farinha de Laranja; X<sub>2</sub>: Resíduo de óleo de cozinha industrial; X<sub>3</sub>: tempo.

Conforme a Tabela 10, observa-se que valores elevados de concentração de FL e de ROI podem influenciar de forma negativa na atividade lipolítica, termo quadrático  $x_1$  e  $x_2$ , respectivamente. Já a interação entre a concentração de farinha de laranja e o tempo de fermentação pode influenciar de forma positiva. Tais resultados mostram a importância do estudo das exigências metabólicas do microrganismo e o tempo necessário para degradação dos resíduos em diferentes concentrações, como será demonstrado adiante neste trabalho.

Com base na Tabela 10, o modelo ajustado foi obtido e está descrito na EQUAÇÃO 6.

$$\text{Atividade lipolítica (U. mL)} = 0,334 - 0,020x_1 - 0,036x_1^2 + 0,006x_2 - 0,032x_2^2 + 0,052x_3 - 0,014x_3^2 + 0,022x_1 * x_2 + 0,073x_1 * x_3 + 0,011x_2 * x_3$$

6)

Posteriormente, construiu-se superfícies de resposta para a resposta atividade lipolítica, demonstradas através das Figuras 3, 4 e 5. A análise de superfície de respostas auxilia na compreensão dos valores ótimos dos fatores independentes e também da relação entre eles. As variáveis não explícitas foram fixadas nos pontos centrais para construção da superfície de resposta.

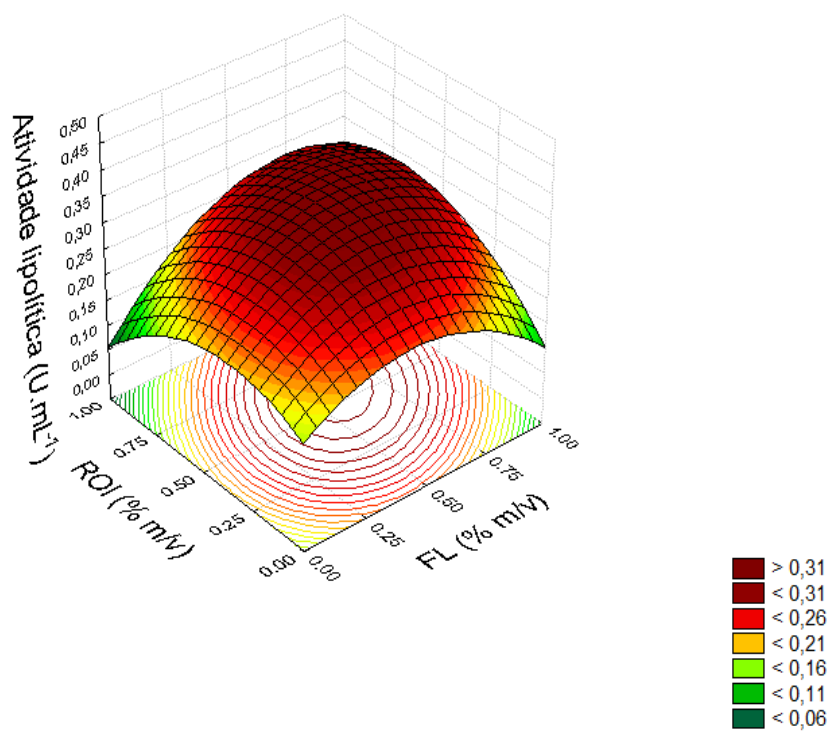


Figura 3. Superfície de resposta 3D: Atividade lipolítica com o tempo fixo no ponto central.

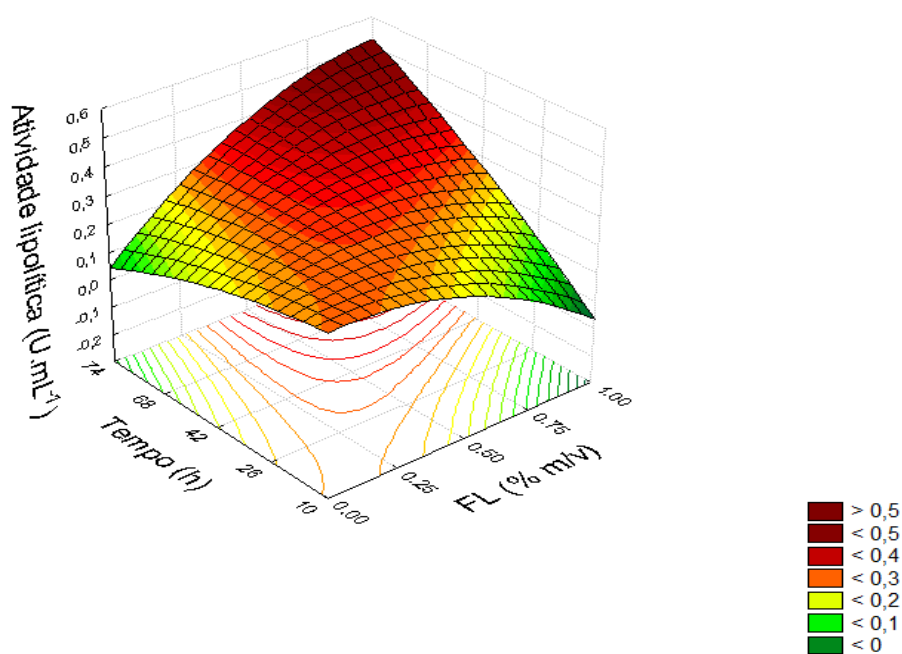


Figura 4. Superfície de resposta 3D: atividade lipolítica com ROI fixo no ponto central.



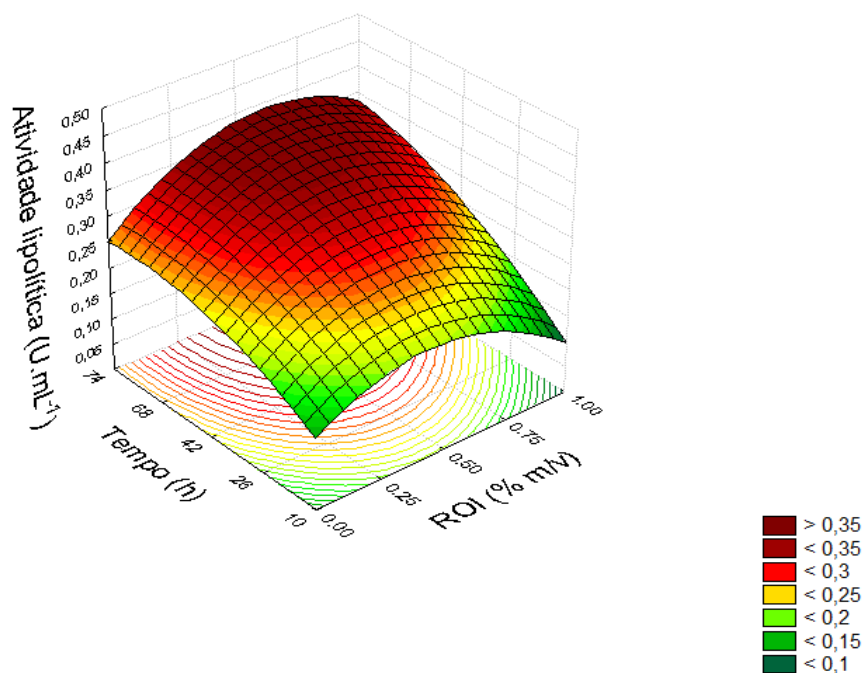


Figura 5. Superfície de resposta 3D: atividade lipolítica com FL fixo no ponto central.

Na Figura 3, observa-se que com o tempo de fermentação fixado ao nível central (42h), as concentrações de FL e de ROI que possibilitaram uma atividade lipolítica mais elevada foram em torno de 0,50 (% m/v) e entre 0,55% e 0,75% (% m/v), respectivamente. De acordo com a superfície obtida, concentrações muito baixas de FL e ROI ou o aumento simultâneo desses a partir de 0,75 (% m/v) no meio, produzem o decaimento da atividade lipolítica, sendo o excesso de nutrientes no meio um fator inibidor na produção de enzimas.

Na Figura 4, pode-se verificar a interação entre o tempo e a farinha de laranja para produção de lipases. Conforme o observado, com ROI fixado ao nível central (0,55% m/v), com o aumento da concentração da FL e do tempo de fermentação, obtém-se maiores valores de atividade lipolítica por *Bacillus licheniformis*, o que está relacionado com o tempo necessário para o microrganismo degradar os componentes complexos presentes nos resíduos liberando substâncias simples que serão utilizadas pela máquina metabólica do microrganismo como fonte de energia para produzir a enzima.

Na literatura, também se observou longos períodos de tempo para fermentação e produção máxima de lipases com resíduos agroindustriais, como

constatado no presente trabalho (Selvakumar e Sivashanmugam, 2017; Tacin et al., 2019). Amin e colaboradores (2011) estudaram o efeito de vários parâmetros sobre a produção de lipases por *Ganoderma lucidum* e otimizaram as condições utilizando a metodologia de superfície de resposta. Os autores observaram a interação significativa entre a concentração do substrato (torta de óleo de canola) e o tempo de fermentação para produção da enzima, sendo que os maiores valores de atividade lipolítica foram encontrados quando longos tempos de incubação foram combinados com concentrações medianas do substrato.

Martins e colaboradores (2018) verificaram que a concentração de farinha de maracujá como fonte de carbono no meio influencia na produção enzimática de tal forma que, o uso de concentrações muito baixas ou muito altas combinadas com tempos curtos de fermentação, pode produzir valores inferiores de atividade enzimática, como encontrado no presente trabalho.

O estudo e otimização do meio de cultivo para produção de lipases também foi realizado por Kishan e colaboradores (2013). Ao verificar a interação entre a concentração do substrato (torta de Mahua) e a da glicose, os pesquisadores observaram que os valores máximos de atividade lipolítica foram encontrados quando combinados níveis intermediários de torta de Mahua e de glicose, 6% e 2%, respectivamente, com uma atividade máxima de 9.40 U mL<sup>-1</sup>, valor superior ao encontrado no presente trabalho.

Na Figura 4, está disposta a superfície de resposta para a interação entre o tempo de fermentação e a concentração do óleo. Observa-se que com a FL fixada ao nível central 0,50 (% m/v) e também o ROI no ponto central, torna-se necessário o aumento do tempo de fermentação para se alcançar uma maior atividade lipolítica, sendo ideal o uso de concentrações do ROI entre 0,5 a 0,75 (% m/v). Uma possível explicação para tais resultados é que a atividade lipolítica aumenta com o tempo de fermentação devido ao metabolismo do microrganismo que, inicialmente, produz a enzima e a utiliza na hidrólise do óleo no meio fermentado, e posteriormente se acumula no meio devido à quantidade reduzida de óleo (Tacin et al., 2018). Pesquisadores estudando o tempo de incubação do meio para produção de lipases constataram que quanto maior o tempo, maior a produção de lipases, como demonstrado na presente pesquisa (Joshi et al., 2019).

O ROI presente no meio age como um indutor para produção de lipases e também como uma fonte de carbono mais fácil de ser assimilada pelo

microrganismo quando comparado a FL, sendo assim, sugere-se que o aumento de sua concentração possibilita a estimulação da secreção da enzima, necessitando assim, de concentrações menores de farinha. A atuação de resíduo de óleo como indutor na produção de lipases foi constatada por Xiaoyan et al. (2017), assim como encontrado no presente trabalho. Os pesquisadores produziram lipase utilizando resíduo de óleo de cozinha por *Yarrowia lipolytica* M53. Quando compararam com outras substâncias oleosas, tais como azeite de oliva, soja, girassol e colza e ácido oleico, observaram que esse resíduo foi mais favorável para produção da enzima, com atividade máxima de 12,7 U.mL<sup>-1</sup> em 24 h, o que pode ser devido à presença de ácidos graxos livres no meio.

Açikel et al. (2010) otimizando os componentes do meio para a produção de lipases por *Rhizopus delemar* utilizando a metodologia de superfície de resposta, verificaram que as fontes indutoras lipídicas foram os parâmetros significativos para a produção de lipases. Também, os autores verificaram que a atividade lipolítica aumentava à medida que concentrações superiores de óleo de girassol foram utilizadas, no entanto, a partir de 1,11% de óleo de girassol, a atividade diminuiu.

Domínguez et al. (2010) também observaram que o óleo de cozinha residual presente no meio levou a um aumento significativo na produção de lipase extracelular por *Yarrowia lipolytica*, confirmando a adequação do resíduo estudado como um indutor para biossíntese da lipase, fato extremamente relevante do ponto de vista econômico.

A produção e a quantificação da atividade enzimática no meio fermentativo estão relacionadas com os fatores de crescimento do microrganismo responsável pelo processo. Um dos fatores mais relevantes a se considerar para realização de um processo fermentativo é o pH (Barbosa et al., 2014), pois o microrganismo pode sofrer uma possível limitação em relação às suas condições ótimas para crescimento e multiplicação celular, bem como para secreção de algum produto de interesse biotecnológico, no caso da presente pesquisa, a enzima lipase.

A anova para a resposta pH está disposta na Tabela 11. De acordo com a anova, o modelo ajustado foi significativo pelo teste F ( $p < 0,05$ ), apresentando porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) de 83,77%.

Tabela 11. Análise de variância realizada para a resposta pH do meio contendo FL e ROI com tempo de fermentação variável por *Bacillus licheniformis*

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	F crítico
Regressão	4,824	9	0,536	4,024	3,68
Resíduo	0,932	7	0,133		
Falta de Ajuste	0,923	5	0,185	41,655	19,30
Erro Puro	0,009	2	0,004		
Total	6,688	23			

Os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para as medidas do pH estão dispostos na Tabela 12. Segundo a tabela, os parâmetros significativos em 5% de significância ( $p < 0,05$ ), foram o termo quadrático da Farinha de Laranja e o termo linear para o tempo estudado.

Tabela 12. Coeficiente de regressão dos parâmetros para a resposta pH conforme o DCCR

Fatores	Coef. de Regressão	p- valor
Média	8,025	0,000
X1	0,083	0,428
X1 <sup>2</sup>	0,192	0,120
X2	-0,065	0,532
X2 <sup>2</sup>	0,007	0,952
X3	0,553	0,001
X3 <sup>2</sup>	0,065	0,568
X1 * X2	0,053	0,696
X1 * X3	0,008	0,955
X2 * X3	0,005	0,970

X1: Farinha de Laranja; X2: Resíduo de óleo de cozinha industrial; X3: tempo.

Com base na Tabela 12, o modelo ajustado que foi obtido está apresentado na Equação 7:

$$pH = 8,025 + 0,083x_1 + 0,192x_1^2 - 0,065x_2 + 0,007x_2^2 + 0,553x_3 + 0,065x_3^2 + 0,053x_1*x_2 + 0,008x_1*x_3 + 0,005x_2*x_3 \quad (7)$$

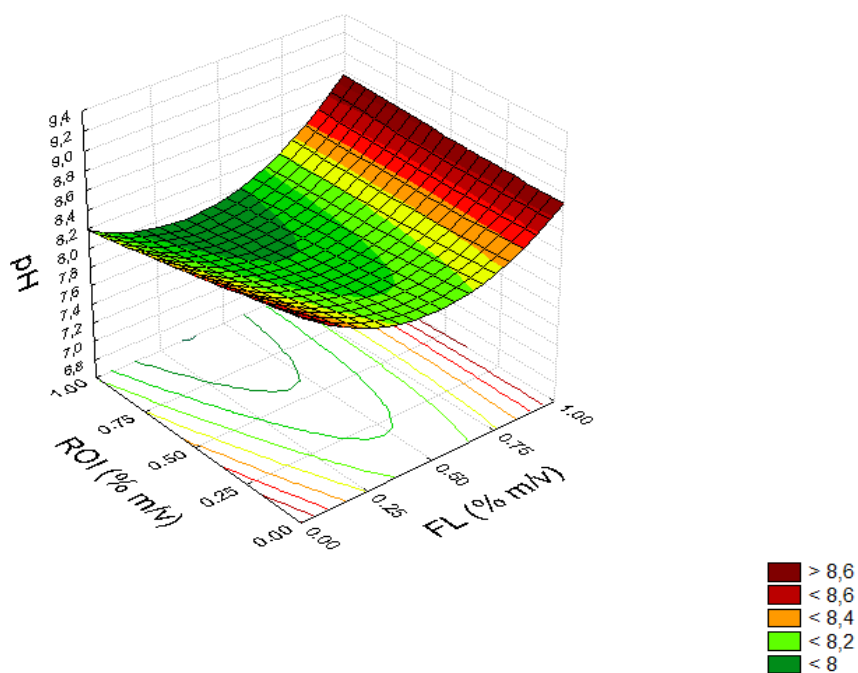


Figura 6. Superfície de resposta 3D: pH com o tempo fixo no ponto central.

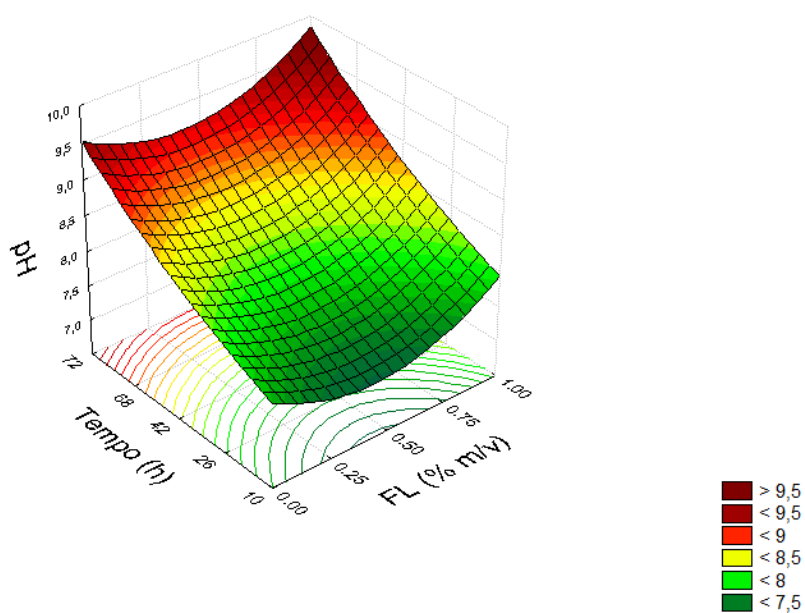


Figura 7. Superfície de resposta 3D: pH com ROI fixo no ponto central.

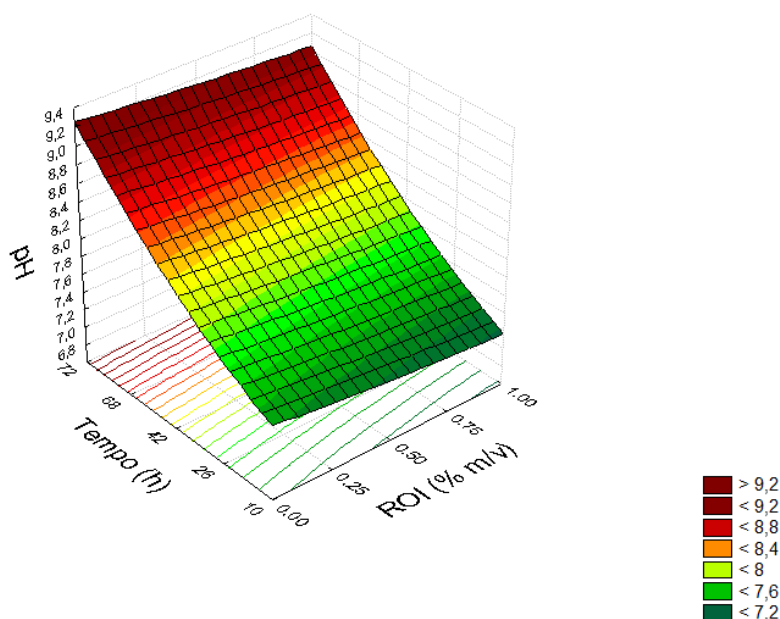


Figura 8. Superfície de resposta 3D: pH com FL fixo no ponto central.

Nas Figuras 6, 7 e 8 pode-se observar as superfícies de resposta para o pH do meio para produção de lipases. De acordo com a figura 7, quanto maior a concentração de FL e do ROI, maior o pH, sendo que durante o tempo de fermentação o pH do meio aumenta independente da concentração de FL (Figura 8) e da concentração do ROI (Figura 9). O pH do meio ao final da fermentação se apresentou mais alcalino e isso pode ter ocorrido devido ao consumo de nitrogênio orgânico no meio pelo microrganismo, como suposto por Ladeira et al. (2015) e Oliveira et al. (2014).

O pH do meio influencia o comportamento da estrutura tridimensional de lipase, como observado por Esakkiraj et al. (2017). Ao analisar a enzima lipase produzida por *Bacillus* sp. PU1 em diferentes pH, observaram que a enzima não apresentou flexibilidade conformacional quando exposta em pH 5 e 7, no entanto, em pH 9 houve o dobramento da enzima necessário para catálise.

Brozzoli et al. (2009) observaram como o pH afeta a produção de lipase por *Candida cylindracea* NRRL Y-17506 utilizando o efluente do processamento de azeitona como substrato suplementado com azeite de oliva e cloreto de amônio. Ao realizar o experimento em um reator de 3 litros sob agitação, verificaram que a atividade da lipase foi baixa  $1,8 \text{ U mL}^{-1}$  quando o pH foi mantido constante em 6,5, aumentou significativamente quando o pH não foi mantido constante para  $18,7 \text{ U mL}^{-1}$ .

### 5.3 Estudo das condições de produção de lipase utilizando o DCCR - Efeito do pH e temperatura

Para estudar as condições de pH inicial e temperatura ótima para a produção de lipases, utilizou-se um DCCR do tipo 2<sup>2</sup> com 4 pontos axiais e 4 pontos centrais como meio de cultura contendo FL, ROI durante 42h de fermentação sob agitação de 150 rpm. Na Tabela 13, estão expressos os valores codificados e os valores reais das variáveis independentes, bem como os resultados para as respostas atividade lipolítica e pH final do meio. De acordo com a referida Tabela, os valores de atividade lipolítica e pH variaram de  $1,399 \times 10^{-1}$  a  $6,250 \times 10^{-1}$  U.mL<sup>-1</sup> e 7,43 a 8,66, respectivamente.

Tabela 13. Matriz do DCCR 2<sup>2</sup> com os valores codificados e os valores reais das variáveis independentes estudadas com o meio de cultura otimizado

Ensaio	Temperatura (°C)	pH inicial	Atividade lipolítica (U mL <sup>-1</sup> )	pH final
1	(-1) 33,6	(-1) 6	$2,059 \times 10^{-1}$	7,43
2	(+1) 51,4	(-1) 6	$5,988 \times 10^{-1}$	7,54
3	(-1) 33,6	(+1) 8,5	$2,928 \times 10^{-1}$	8,21
4	(+1) 51,4	(+1) 8,5	$6,250 \times 10^{-1}$	8,44
5	(-1,41) 30	(0) 7,2	$2,972 \times 10^{-1}$	7,80
6	(+1,41) 55	(0) 7,2	$2,622 \times 10^{-1}$	8,92
7	(0) 42,5	(-1,41) 5,5	$1,399 \times 10^{-1}$	7,43
8	(0) 42,5	(+1,41) 6	$3,343 \times 10^{-1}$	8,66
9	(0) 42,5	(0) 7,2	$4,086 \times 10^{-1}$	7,92
10	(0) 42,5	(0) 7,2	$4,633 \times 10^{-1}$	7,86
11	(0) 42,5	(0) 7,2	$5,048 \times 10^{-1}$	7,89
12	(0) 42,5	(0) 7,2	$4,479 \times 10^{-1}$	7,87

Após a análise estatística verificou-se que o modelo não foi significativo em nível de 5% de significância para a atividade lipolítica através da ANOVA pelo teste F calculado, não sendo possível a construção de superfícies de resposta. Contudo, o Diagrama de Pareto para atividade lipolítica está apresentado na Figura 9.

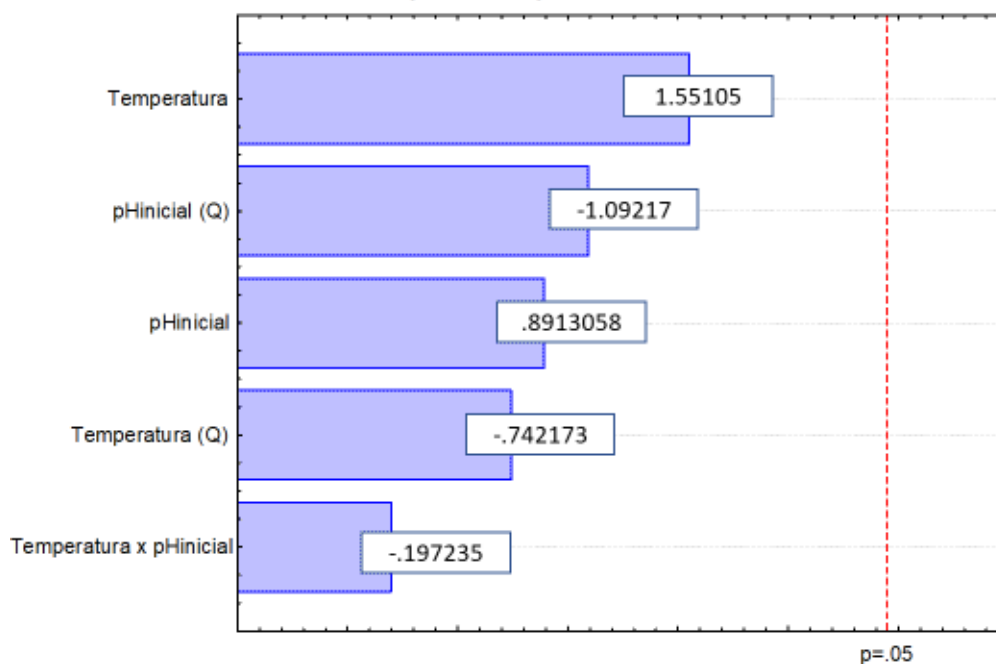


Figura 9. Diagrama de Pareto para a atividade lipolítica, em nível de 5% de significância em meio contendo FL, ROI durante 42h de fermentação a 150 rpm.

Para a produção de lipases por *Bacillus licheniformis*, nenhuma variável teve efeito significativo com a realização do planejamento experimental do tipo  $2^2$  DCCR, como pode ser observado no Diagrama de Pareto (Figura 9). Através da Figura 9, observa-se que valores elevados de temperatura e pH atuam efetivamente na produção de lipase e valores extremos destas variáveis, como temperatura muito elevados e pH acima da neutralidade, influenciam negativamente na atividade enzimática.

O planejamento e análise estatística utilizados têm se mostrado bastante eficientes na otimização das condições de pH e temperatura para produção de enzimas, como demonstrado por Selvakumar e Sivashanmugam (2017), e o



conhecimento desses fatores é essencial para a aplicação da enzima no ramo industrial. Entretanto, supõe-se, a partir de observações realizadas no laboratório, que o microrganismo utilizado no presente trabalho pode secretar diferentes lipases em condições variadas de pH e temperatura, o que dificulta o processo de otimização utilizando essa ferramenta estatística.

Para o pH final do meio contendo a ANOVA está disposto na Tabela 14. De acordo com a ANOVA (teste F;  $p < 0,05$ ), o modelo ajustado apresentou uma porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) boa, de 84,93%.

Tabela 14. ANOVA para pH final do meio contendo FL, ROI durante 42h de fermentação, a 150 rpm por *Bacillus licheniformis*

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F. Calculado	F crítico
Regressão	2,098	5	0,420	6,751	4,39
Resíduo	0,373	6	0,062		
Falta de Ajuste	0,371	3	0,124	176,606	9,28
Erro Puro	0,002	3	0,001		
Total	2,471	11			

A superfície de resposta para o pH final do meio está na Figura 10. Conforme observado, o pH do meio após 42h de fermentação aumenta de acordo com o aumento do pH inicial e da temperatura de incubação para a produção de lipases.

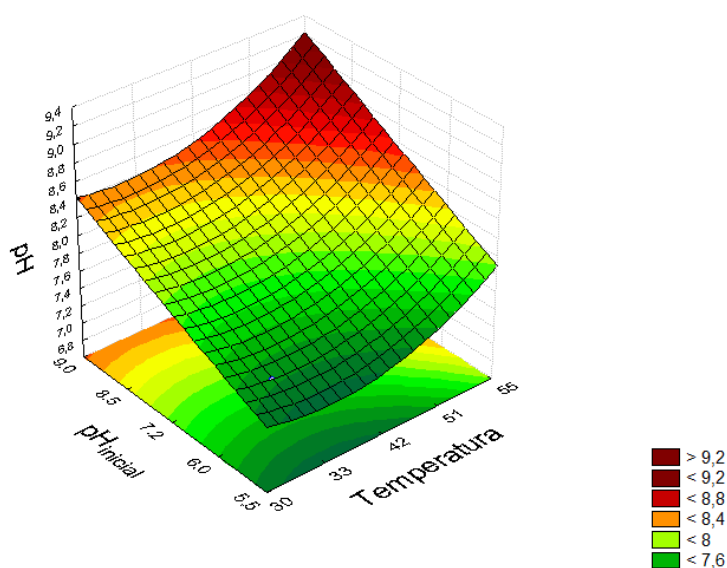


Figura 10. Superfície de resposta 3D: pH final para o meio fermentativo com FL, ROI durante 42h de fermentação.

Eddehech et al. (2018) observaram a produção de uma lipase extracelular de *Serratia* sp. W3 com uma atuação em uma ampla faixa de pH 5 – 12, e com atividade ótima em pH 9 a 55°C, porém, os autores não estudaram a otimização do meio com a metodologia de superfície de resposta.

Sreelatha et al. (2016) estudando os fatores físicos para a produção de lipase como pH e temperatura, observaram que o pH do meio influenciou significativamente a secreção da enzima pelo microrganismo, sendo que o aumento ou diminuição da alcalinidade ou acidez do presente meio diminuiu a atividade da lipase e o melhor pH foi registrado em 6,0-7,0.

Thabet et al. (2012) isolaram uma levedura *Sporobolomyces salmonicolor* OVS8 oriunda de um derramamento de moenda de óleo, submeteram a cepa à mutagênese e verificaram que o pH influenciou no crescimento da cepa e produção da enzima, sendo que o valor ótimo foi o de pH 6.

#### 5.4 Avaliação da presença das hidrolases: protease, avicelase, carboximetilcelulase, amilase e xilanase

Os resultados obtidos após a avaliação da presença de enzimas hidrolases no meio contendo FL e ROI (item 4.2) estão dispostos na Tabela 15. Conforme a mesma, verificou-se a presença de todas as enzimas pesquisadas, exceto da enzima caboximetilcelulase, confirmando a capacidade de *Bacillus licheniformis* de sintetizá-las.

Tabela 15. Atividade enzimática de hidrolases no meio otimizado contendo FL, ROI durante 42h de fermentação, a 150 rpm por de *Bacillus licheniformis*

Enzima	Atividade enzimática
Avicelase	$8,69 \times 10^{-2} \text{ U.mL}^{-1}$
Carboximetilcelulase	*
Protease	$11,6 \text{ U.mL}^{-1}$
Amilase	$2,16 \times 10^{-2} \text{ U.mL}^{-1}$
Xilanase	$2,17 \times 10^{-1} \text{ U.mL}^{-1}$
Lipase	$3,80 \times 10^{-1} \text{ U.mL}^{-1}$

\*Não apresentou atividade enzimática nas condições do ensaio.

A farinha de laranja utilizada no estudo possui uma grande quantidade de carboidratos e fibras (Tabela 2). Dentro dos grupos mencionados, podem estar presentes hexose e arabinose, celulose e hemicelulose, amido, lignina, pectina, entre outros (Rivas et al., 2008). Devido a essa composição, a farinha foi um substrato interessante para a produção das enzimas pesquisadas.

Marín et al. (2018) selecionou resíduos lignocelulósicos para a produção de celulasas por fermentação em estado sólido, e dentre eles, a casca de laranja, utilizando um composto de material digerido de resíduos sólidos urbanos para atuar como inóculo, porém, não observou um aumento nos valores da atividade da enzima em relação à atividade do resíduo bruto, não sendo produzidas quantidades significativas.

Bansal et al. (2012) testaram vários resíduos agrícolas e de cozinha para produção de celulase por *Aspergillus Níger* NS-2 em fermentação no estado sólido, dentre eles, a casca de laranja. Os autores observaram uma baixa atividade de carboximetilcelulase ( $1,0 \pm 0,003 \text{ U gds}^{-1}$ ) quando utilizaram as cascas como substrato sem nenhum tratamento químico, porém, quando as cascas foram tratadas com hidróxido de sódio e ácido sulfúrico, obteve-se um aumento de atividade de  $68,6 \pm 1,9 \text{ (U gds}^{-1}\text{)}$  e  $90,1 \pm 0,99 \text{ (U gds}^{-1}\text{)}$ , para cada um, respectivamente. Castro et al. (2015) estudaram um sistema baseado na formulação de substratos utilizando resíduos agroindustriais (casca de laranja, farelo de trigo, farelo de soja e farelo de algodão) para a produção de protease por *Aspergillus ninger* por fermentação em estado sólido. Os autores verificaram um aumento na produção de protease de 7,6% a 581,7% quando comparado a substratos individuais, durante 48 h de fermentação, atingindo uma atividade máxima de  $245,97 \text{ Ug}^{-1}$ .

Também, Mounaimen e Mahmoud (2015) utilizaram os resíduos da laranja oriundos da produção de sucos como fonte de carbono para produção de  $\alpha$ -amilase por *Streptomyces* sp., e, observaram que as mudanças na concentração do substrato (5-15%), NaCl (0 – 6,5%), quantidade de inóculo (5-10%) e pH influenciam significativamente de forma positiva a produção da enzima, com atividade da enzima de  $8,26 \text{ U mL}^{-1}$  após 5 dias em fermentação submersa.

Nighojkar et al. (2006) utilizaram cascas de laranja como indutor na produção de poligalacturonase por *Aspergillus ninger* em células imobilizadas e alcançaram uma atividade máxima utilizando 1,5% do indutor durante 72 horas. Também, Ahmed et al. (2016) produziram pectinases por *Aspergillus ninger* utilizando casca de laranja (4%) e obtiveram uma atividade máxima da enzima de  $117,1 \pm 3,4 \text{ U mL}^{-1}$ , a  $30^\circ\text{C}$  após 5 dias de fermentação submersa.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

Lipases são enzimas de grande relevância para tecnologia enzimática, sendo responsáveis pela hidrólise das gorduras, óleos e ésteres de ácidos graxos. Objetivou-se com o presente trabalho estudar a produção de lipases por *Bacillus licheniformis* utilizando os coprodutos agroindustriais: farinhas de uva (FU), farinha de laranja (FL) e o melaço (MEL) como fontes de carbono, além do resíduo de óleo de cozinha industrial (ROI) como fonte indutora, obtendo-se um meio que forneça máxima produção enzimática.

Preparou-se o inóculo com a bactéria e estudou-se a influência da aplicação da FL, FU, MEL e ROI para produção de lipases. Posteriormente, a FL foi selecionada para o estudo do tempo de fermentação interagindo com os componentes do meio escolhido para produção de lipases utilizando um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), onde as variáveis independentes foram FL, ROI e tempo de fermentação. O efeito do pH e da temperatura (°C) foram estudados após a obtenção das melhores condições do meio de cultura através do planejamento DCCR.

Após a obtenção das melhores condições do meio e do processo fermentativo para a produção de lipases, realizou-se análises para a detecção da presença de outras enzimas como: protease, avicelase, carboximetilcelulase, amilase, xilanase e lipase. A partir do estudo realizado, conclui-se que:

- A farinha de laranja possui potencial para aplicação em processos fermentativos visando à obtenção de lipases por *Bacillus licheniformis*;

- O estudo da interação entre FL, ROI em diferentes concentrações e tempo de fermentação através do DCCR aliado à metodologia de superfície de resposta possibilitou encontrar uma condição boa para a produção de lipases, sendo esta: 0,50 (% m/v) de FL, entre 0,50 e 0,75 (% m/v) de ROI com o tempo de fermentação de 42 horas;
- O estudo do pH e temperatura do processo fermentativo para produção de lipases não forneceu nenhuma variável com efeito significativo após a realização do planejamento experimental do tipo DCCR 2<sup>2</sup>;
- A bactéria *Bacillus licheniformis* isolada do solo utilizado no presente trabalho também produz as enzimas protease, avicelase, amilase, e xilanase nas condições estudadas para produção de lipases utilizando a FL e ROI, com destaque para a protease, enzima com maior valor de atividade dentre todas as pesquisadas. No entanto, a bactéria não produz a enzima carboximetilcelulase.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Açikel, Ü., Erşan, M., Sağ Açikel, Y. (2010) Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. *Food and Bioproducts Processing*, 88(1): 31–39.
- Ahmed, I., Zia, M.A., Hussain, M.A., Akram, Z., Naveed, M.T., Nowrouzi, A. (2015) Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*, its purification and characterization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(2): 148–154.
- Almeida, A.F. de. (2012) *Produção, purificação e propriedades bioquímicas de lipase ácida de Candida viswanathii*. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Rio Claro - RJ, Universidade Estadual Paulista. 212p.
- Amin, F., Bhatti, H.N., Rehman, S. (2011) Optimization of growth parameters for lipase production by *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, 10(28): 5514-5523.
- Anobom, C.D., Pinheiro, A.S., De-Andrade, R.A., Aguiéiras, E.C.G., Andrade, G.C., Moura, M.V., Almeida, R.V., Freire, D.M. (2014) From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases. *Biomed Res Int*, 2014:1–11.

- Babbar, N., Oberoi, H.S. (2014) Enzymes in value-addition of agricultural and agro-industrial residues. *Enzymes in Value-Addition of Wastes*. Québec: Nova Publishers. 29–50p.
- Bala, A., Singh, B. (2015) Cost-effective production of biotechnologically important hydrolytic enzymes by *Sporotrichum thermophile*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39: 181–191.
- Barbosa, J.B., Gentil, N.O., Ladeira, S.O., Martins, M.L.L. (2014) Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Journal Biocatalysis and Biotransformation*, 32(4): 244–250.
- Barros, M., Fleuri, L.F., Macedo, G.A. (2010) Seed lipases: Sources, applications and properties - A review. *Brazilian Journal Chem Eng*, 27: 15–29.
- Barros Neto, B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. (1996) *Planejamento e otimização de experimentos*. 2 ed. Campinas: Editora da UNICAMP. 299p.
- Bansal, N., Tewari, R., Soni, R., Soni, S.K. (2012) Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management*, 32: 1341–1346.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2004) *Bioquímica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1043p.
- Bharathi, D., Rajalakshmi, G., Komathi, S. (2018) Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. *J King Saud Univ – Sci*, 10–13.
- Box, G.E.P., Drapper, N.R. (1978) *Statistics for experimenters: An introduction to designs, data analysis and model building*. Wiley: New York, 1978.
- Brozzoli, V., Crognale, S., Sampedro, I., Federici, F., D'Annibale, A., Petruccioli, M. (2009) Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresource Technology*, 100:3395–3402.



- Burcu Bakir, Z., Metin, K. (2017) Production and Characterization of an Alkaline Lipase from Thermophilic *Anoxybacillus* sp. HBB16. *Chem Biochem Eng Quim*, 31:303–312.
- Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R., Gama, M. (2003) *Engenharia Enzimática*. 1. ed. Lisboa: Lidel Edições técnicas, Lda. 250p.
- Cardenas, F., Alvarez, E., de Castro-Alvarez, M.S., Sanchez-Montero, J.M., Valmaseda, M., Elson, S.W., Sinisterra, J.V. (2001) Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 14:111-123.
- Castro, A.M. de, Andréa, T.V. de, Carvalho, D.F., Teixeira, M.M.P., Reis Castilho, L. dos, Freire, D.M.G. (2011) Valorization of residual agroindustrial cakes by fungal production of multienzyme complexes and their use in cold hydrolysis of raw starch. *Waste and Biomass Valorization*, 2:291–302.
- Castro, R.J.S. de, Ohara, A., Nishide, T.G., Bagagli, M.P., Gonçalves Dias, F.F., Sato, H.H. (2015) A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4: 678–684.
- Castro, H.F. de, Mendes, A.A., Santos, J.C. dos, Aguiar, C.L. de (2004) Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim Nova*, 27: 146– 156.
- Castro., H.F., Anderson, W.A. (1995) Fine chemicals by biotransformations using lipases. *Food Business Consulting*, 18: 544–554.
- Cavalcanti, E.; d’Avila, C., Gutarra, M.L.E., Freire, D.M.G., Castilho, L. dos R., Sant’Anna Júnior, G.L. (2005) Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48:79– 84.
- Chiou, S.H., Wu, W.T. (2004) Immobilization of *Candida rugose* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*. 25:197–204.
- Citrusbr (2017) Anuário da Citricultura 2017. 1ª edição, p. 1-60. São Paulo, Brasil. <[http://www.citrusbr.com/download/biblioteca/CitrusBR\\_Anuario\\_2017\\_alta.pdf](http://www.citrusbr.com/download/biblioteca/CitrusBR_Anuario_2017_alta.pdf)> Acesso em 12 de junho de 2018.

- Colla, L.M., Christian, O.R., Jorge, A.V.C. (2012) Applications and production of microbial lipases. *Rev Ciatic*, 4:1–14.
- Colla, L.M., Primaza, A.L., Benedettia, S., Lossa, R.A., Lima, M., Reinehra, C.O., Bertolina, T.E., Costa, J.A.V. (2016) Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47:461-457.
- Conab (2018) *Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar*, v.5 - Safra 2018/19, n. 1 - Primeiro levantamento, Brasília, p.1-62.
- Costa, E.A. (2017) *Formulação de um meio de cultura para a produção de celulases por Bacillus sp. e potencial das enzimas para hidrolisar a celulose*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes -RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense.62p.
- Morais, W.G. de, Kamimura, E.S., Ribeiro, E.J., Pessela, B.C., Cardoso, V.L., Resende, M.M. de (2016) Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugose* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. *Protein Expr Purif*, 123:26–34.
- Dekker, P.J.T., Daamen, C.B.G. (2011) Enzymes exogenous to milk in dairy technology - Lipase. *Encycl Dairy Sci*, 276–283.
- Domínguez, A., Deive, F.J., Sanromán, M.A., Longo, M.A. (2010) Biodegradation and utilization of waste cooking oil by *Yarrowia lipolytica* CECT 1240. *Eur J Lipid Sci Technol*, 112:1200–1208.
- Eddehech, A., Zied, Z., Aloui, F., Smichi, N., Noiriél, A., Abousalham, A., Gargouri, Y. (2018) Production, purification and biochemical characterization of a thermoactive, alkaline lipase from a newly isolated *Serratia* sp. W3 Tunisian strain. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123: 792-800.
- Egorova, K., Antranikian, G. (2005) Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Curr Opin Microbiol*, 8: 649–655.
- Esmaili, M., Yolmeh, M., Shakerardakani, A., Golivari, H. (2015). A central composite design for the optimizing lipase and protease production from

*Bacillus subtilis* PTCC 1720. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(3), 349–354.

Esakkiraj, P., Antonyraj, C.B., Meleppat, B., Ankaiaha, D., Ayyanna, R., Ahamed, S.I.B., Arul, V. (2017). Molecular characterization and application of lipase from *Bacillus* sp. PU1 and investigation of structural changes based on pH and temperature using MD simulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103:47-56.

Farias, C.M. de M. (2013) Produção e caracterização de lipases por *Aspergillus* da micoteca urm utilizando resíduo de licuri (*Syagrus coronata*) (Martius) Beccari como substrato. *J Chem Inf Model*, 53: 1689–1699.

Farnet, A.M., Qasemian, L., Goujard, L., Gil, G., Guiral, D., Ruaudel, F., Ferre, E. (2010) A modified method based on p-nitrophenol assay to quantify hydrolysis activities of lipases in litters. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 386-389.

Feltrin, V.P., Sant'Anna, E.S., Porto, A.C.S., Torres, R.C.O. (2000) Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. *Braz arch biol technol*, 43:1.

Fernández-López, J., Sendra-Nadal, E., Navarro, C., Sayas, E., Viuda-Martos, M., Alvarez, J.A.P. (2009) Storage stability of a high dietary fibre powder from orange by-products. *International Journal of Food Science & Technology*, 44: 748–756.

Freedonia. (2016) *World enzymes: industry study with forecasts for 2020 & 2025*. <<https://www.freedoniagroup.com/brochure/34xx/3417smwe.pdf>> acesso em 02 de dez. 2016.

Food Ingredients Brasil (2014). Dossiê óleos. *Revista FiB*, n. 31, pg. 38-55. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/416.pdf>> Acesso em 20 de dezembro de 2019.

Frantz, S.C., Paludo, L.C., Stutz, H., Spier, M.R. (2018) Production of amylases from *Coprinus comatus* under submerged culture using wheat-milling by-products: optimization, kinetic parameters, partial purification and characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17:82-92.

- Geoffry, K., Achur, R. N. (2018) Screening and production of lipase from fungal organisms. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14: 241–253.
- Ghanem, A. (2007) Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*, 63: 1721–1754.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl Chem.*, 59: 257-268p.
- Godoy, M.G., Gutarra, M.L.E., Castro, A.M., Machado, O.L.T., Freire, D.M.G. (2011) Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: Production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 38: 945–953.
- Gomes, E., Guez, M.A.U., Martin, N., Silva, R. da (2007) Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Quim Nova* 30:136–145.
- Gricajeva, A., Bendikienė, V., Kalėdienė, L. (2016) Lipase of *Bacillus stratosphericus* L1: Cloning, expression and characterization. *Int J Biol Macromol.* 92: 96–104.
- Gricajeva, A., Kazlauskas, S., Kalėdienė, L., Bendikienė, V. (2017) Analysis of *Aspergillus* sp. lipase immobilization for the application in organic synthesis. *Int J Biol Macromol*, 108:1165 -1175.
- Guo, J., Chen, C.P., Wang, S.G., Huang, X. J. (2015). *A convenient test for lipase activity in aqueous-based solutions.* *Enzyme and Microbial Technology*, 71: 8–12.
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. (2004) Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 763–781.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol*, 39: 235–251.
- He, J., Wu, A., Chen, D., Yu, B., Mao, X., Zheng, P., Tian, G. (2014) Cost-Effective lignocellulolytic enzyme production by *Trichoderma reesei* on a cane molasses medium. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1):43.

- Hernandes, J.V. (2014) *Elaboração de farinha de uva a partir de subproduto da indústria vitivinícola: qualidade nutricional e de compostos bioativos*. Monografia (Especialização em Processos Agroindustriais) Bagé - RS, Universidade Federal do Pampa, 38p.
- IBGE (2018). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - dezembro 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>> Acesso em 16 de janeiro de 2018.
- Illanes, A. (2008) *Enzyme biocatalysis: Principles and applications*. Valparaíso: Editora Springer, 1-391p.
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 16: 396–403.
- Jay, J.M. (2005) *Microbiologia de Alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artemed. 711p.
- Johnvesly, B., Naik, G.R. (2001) Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*, 37: 139 -144.
- Joshi, R., Sharma, R., Kuila, A. (2019). Lipase production from *Fusarium incarnatum* KU377454 and its immobilization using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs for application in waste cooking oil degradation. *Bioresource Technology Reports*, 5:134-140.
- Jung, D.U., Yoo, H.Y., Kim, S.B., Lee, J.H., Park, C., Kim, S.W. (2015). Optimization of medium composition for enhanced cellulose production by mutant *Penicillium brasilianum* KUEB15 using statistical method. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 25:145–150.
- Kalishwaralal, K., Gopalram, S., Vaidyanathan, R., Deepak, V., Pandian, S.R.K., Gurunathan, S. (2010). Optimization of  $\alpha$ -amylase production for the green synthesis of gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77(2): 174–180.
- Kishan, G., Gopalakannan, P., Muthukumaran, C., Thirumalai Muthukumaresan, K., Dharmendra Kumar, M., Tamilarasan, K. (2013) Statistical optimization of critical medium components for lipase production from *Yarrowia lipolytica*

(MTCC 35). *Journal of Genetic Eng and Biotech.* 11:111-116.

Kist, B.B. (2018) *Anuário Brasileiro de Fruticultura*. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 88 p.

Kiran, B., Pathak, K., Kumar, R., Deshmukh, D. (2016). Statistical optimization using Central Composite Design for biomass and lipid productivity of microalga: Astep toward enhanced biodiesel production. *Ecological Engineering*, 92:73– 81.

Koc, M., Cokmus, C., Cihan, A.C. (2015) The genotypic diversity and lipase production of some thermophilic bacilli from different genera. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46: 1065-1076.

Kumar, V., Shukla, P. (2018) Extracellular xylanase production from *T. lanuginosus* VAPS24 at pilot scale and thermostability enhancement by immobilization. *Process Biochemistry*, 71:53–60.

Ladeira, S.A., Cruz, E., Delatorre, A.B., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18: 110–115.

Li, N., Zong, M.H. (2010) Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. *J Mol Catal B Enzym*, 66: 43–54.

Lima, U. de A., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. (2001) *Biotecnologia Industrial* vol. 3: Processos Fermentativos e Enzimáticos. ed. 1. São Paulo: Blucher. 593p.

Liu, C.H., Huang, C.C., Wang, Y.W., Chang, J.S. (2012) Optimizing lipase production from isolated *Burkholderia* sp. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 43: 511–516.

Liu, X., Kokare, C. (2017) Microbial Enzymes of Use in Industry. *Biotechnology of Microbial Enzymes*, p. 267–298.

Dharmsthiti, S.D., Luchai, S. (1999) Production, purification, and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027, *FEMS Microbiology Letters*. 179: 241-246.

- Madeira, J.V., Contesini, F.J., Calzado, F., Rubio, M.V., Zubieta, M.P., Lopes, D.B., de Melo, R. R. (2016) Agro-Industrial residues and microbial enzymes: an overview on the eco-friendly bioconversion into high value-added products. *Elsevier Inc.*, 475-511p.
- Marín, M., Sánchez, A., Artola, A. (2018) Production and recovery of cellulases through solid-state fermentation of selected lignocellulosic wastes. *Journal of Cleaner Production*, 209: 937-946.
- Martins, M.D., Guimarães, M.W., de Lima, V.A., Gaglioti, A.L., Da-Silva, P.R., Kadowaki, M.K., Knob, A. (2018) Valorization of passion fruit peel by- product: Xylanase production and its potential as bleaching agent for kraft pulp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16:172-180.
- Mendes, A.A., Oliveira, P.C., Castro, H.F. de (2012) Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *Journal Mol Catal B Enzym*, 78: 119–134.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem*, 3:426-428p.
- Moayedallaie, S., Mirzaei, M., Paterson, J. (2010) Bread improvers: Comparison of a range of lipases with a traditional emulsifier. *Food Chem*. 122: 495–499.
- Mohammadi, M., Sepehrizadeh, Z., Ebrahim-Habibi, A., Shahverdi, A.R., Faramarzi, M.A., Setayesh, N. (2016) Enhancing activity and thermostability of lipase A from *Serratia marcescens* by site-directed mutagenesis. *Enzyme Microb Technol*, 93–94: 18–28.
- Morais Júnior, W. G. (2013) *Produção de lipase por Candida rugosa e Geotrichum candidum empregando melão de soja*. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) – Uberlândia - MG, Universidade Federal de Uberlândia, 112p.
- Mouna imen, O., Mahmoud, K. (2015) Statistical optimization of cultural conditions of an halophilic alpha-amylase production by halophilic *Streptomyces* sp. grown on orange waste powder. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4: 685–693.

- Muruci, L.N.M. (2012) *Produção e caracterização de lipase de Aspergillus niger obtida por fermentação no estado sólido utilizando resíduos da agroindústria*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Seropédica - RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 107p.
- Nagarajan, S. (2012) New tools for exploring old friends-microbial lipases. *Appl Biochem Biotechnol*, 168: 1163–1196.
- Naqvi, S.H., Khan, M.Y., Rafiq, M., Dahot, M.U. (2012) Screening of lipase producing Fungi and Catalytic Activity from Molasses Culture Medium. *Sindh Univ. Res. Jour*, 44: 105-112.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2014) *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6.ed. Porto Alegre: Artemed. 1259p.
- Negi, S., Banerjee, R. (2009). Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. *Food Research International*, 42(4), 443–448.
- NC-IUBMB (2018) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB): Enzyme Nomenclature Recommendations. Disponível em:  
<<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/cont3aa.html>> Acesso em 28/12/2017.
- Nighojkar, S., Phanse, Y., Sinha, D., Nighojkar, A., Kumar, A. (2006) Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. *Process Biochemistry*, 41: 1136–1140.
- Niu, L., Wu, J., Liao, X., Chen, F., Wang, Z., Zhao, G., Hu, X. (2008) Physicochemical Characteristics of Orange Juice Samples From Seven Cultivars. *Agricultural Sciences in China*, 7:41–47.
- Okino-Delgado, C.H., Fleuri, L.F. (2014) Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. *Food Chemistry*, 163: 103–107.
- Oliveira, A.C.D., Vargas, J.V.C., Rodrigues, M.L.F., Mariano, A.B. (2013) Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por



fermentação submersa. *Rev Bras de Prod Agroind*, 15: 19-26.

- Oliveira, L.R.C., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L., Martins, M.A. (2014). Extracellular production of avicelase by the thermophilic soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2. *Acta Scientiarum*, 36 (2):215-222.
- Ozturkoglu-Budak, S., Wiebenga, A., Bron, P.A., de Vries, R.P. (2016) Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *Int J Food Microbiol*, 237:17–27.
- Paludo, L.C., Frantz, S.C., Junior, R.A., Stutz, H., Dantas, T.L.P., Spier, M.R. (2018). Optimization, kinetic and bioprocess parameters of amylases production from *Coprinus comatus* under submerged culture using starch- based simple medium: Partial enzyme characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16:529-537.
- Pan, X., Arato, C., Gilkes, N., Gregg, D., Mabee, W., Pye, K., Saddler, J. (2005) Biorefining of softwoods using ethanol organo solv pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnology and Bioengineering*, 90:473–481.
- Pant, G., Prakash, A., Pavani, J.V.P., Bera, S., Deviram, G.V.N.S., Kumar, A., Panchpuri, M., Prasuna, R.G. (2015) Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*, 9(1), 50–55.
- Patil, U., Mokashe, N., Shaha, J., Arthekar, S., Jagatap, H. (2018) Ultrasound-assisted improvement sinbiocatalytic activity and production of organic-solvent stable protease from *Bacillus circulans* MTCC 7942. *Ultrasonics Sonochemistry*, 40,201–205.
- Pedroza-Padilla, C.J., Romero-tabarez, M., Orduz, S. (2017) Actividad lipolítica de microorganismos aislados de aguas residuales contaminadas com grasas. *Biotechnol en el Sect Agropecu y Agroindustrial*, 15: 36–44.
- Penha, E.M., Viana, L.A.N., Gottschalk, L.M.F., Terzi, S.C., Souza, E.F., Freitas, S.C., Santos, J. de O., Salum, T.F.C. (2016) Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger*.

*Ciência Rural* 46: 755–761.

- Praveen Kumar, P., Sagaya Jansi, R., Saravana Kumar, P., Nimal Christudas, I. V.S., Preetam Raj, J. P., Vijayakumar, A., Agastian, P., Ignacimuthu, S. (2017) Optimization of biosynthesis parameters, partial purification and characterization of extracellular lipase from soil derived *Streptomyces* sp. Loyola Lipase-1. *Biocatal Agric Biotechnol*, 12:241–247.
- Qureshi, A.S., Khushk, I., Ali, C.H., Chisti, Y., Ahmad, A., Majeed, H. (2016). Coproduction of protease and amylase by thermophilic *Bacillus* sp. BBXS-2 using open solid-state fermentation of lignocellulosic biomass. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8,146–151.
- Rakchai, N., H-Kittikun, A., Zimmermann, W. (2016) The production of immobilized whole-cell lipase from *Aspergillus nomius* ST57 and the enhancement of the synthesis of fatty acid methyl esters using a two-step reaction. *J Mol Catal B Enzym*, 133:128–136.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E., Miller, R. (2009) Lipases at interfaces: A review. *Adv Colloid Interface Sci*, 147–148: 237–250.
- Resende, R.R., Tereza, L., Souza, D.A., Mendes, A.A. (2017) *Imobilização Enzimática: Princípios fundamentais e tipos de suporte*. Biotecnologia Aplicada à Agroindústria - Vol. 4. Editora Blucher,529-530p.
- Rivas, B., Torrado, A., Torre, P., Converti, A., Domínguez, J.M. (2008) Submerged Citric Acid Fermentation on Orange Peel Autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:2380–2387.
- Rocha, C.P. (2010) *Otimização da produção de enzimas por Aspergillus niger em fermentação em estado sólido*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Uberlândia - MG, Universidade Federal de Uberlândia, 136p.
- Rodrigues, M.I., Lema, A.F. (2009) *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. 2.ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo e da Fraternidade Fée Amor, 2009.
- Roveda, M., Hemkemeier, M., Colla, L.M. (2010) Evaluation of lipase production

using different strains of microorganisms isolated from dairy effluent through submerged fermentation. *Ciência e Tecnol Aliment.* 30: 126–131.

Salihu, A., Bala, M., Alam, M.Z. (2016) Lipase production by *Aspergillus niger* using sheanut cake: An optimization study. *J Taibah Univ Sci*, 10:850–859.

Sánchez Blanco, A., Palacios Durive, O., Batista Pérez, S., Díaz Montes, Z., Pérez Guerra, N. (2016). Simultaneous production of amylases and proteases by *Bacillus subtilis* in brewery wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3): 665–674.

Santos, R.R. dos (2012) *Caracterização e aplicação de borras de refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Seropédica - RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 83p.

Saraswat, R., Verma, V., Sistla, S., Bhushan, I. (2017) Evaluation of alkali and thermotolerant lipase from an indigenous isolated *Bacillus* strain for detergent formulation. *Electron J Biotechnol*, 30: 33–38.

Saun, N.K., Mehta, P., Gupta, R. (2014) Purification and Physicochemical Properties of Lipase from Thermophilic *Bacillus aerius*. *J Oleo Sci* 63: 1261–1268.

Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B., Davidson, W.S. (2003) Purification strategies for microbial lipases. *Curr Trends Biotechnol Pharm*, 11: 144–159.

Scanlon, M.G., Henrich, A.W., Whitaker, J.R. (2018) Factors affecting enzyme activity in foods. *Proteins Food Process*, 270–291.

Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolt, M., Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis and tomorrow. *Nature*, 409: 258–268.

Schmidell, W., Lima, U. de A., Aquarone, E., Borzani, W. (2001) *Biotecnologia Industrial vol. 2: Engenharia Bioquímica*. ed. 1. São Paulo: Blucher. 541p.

Sethi, B.K., Nanda, P.K., Sahoo, S. (2016) Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. *Brazilian J Microbiol.* 47: 143–149.

- Selvakumar, P., Sivashanmugam, P. (2017) Optimization of lipase production from organic solid waste by anaerobic digestion and its application in biodiesel production. *Fuel Processing Technology*, 165:1–8.
- Sharma, A., Meena, K.R., Kanwar, S.S. (2018) Molecular characterization and bioinformatics studies of a lipase from *Bacillus thermoamylovorans* BHK67. *Int J Biol Macromol*, 107: 2131–2140.
- Sharma, P., Sharma, N., Pathania, S., Handa, S. (2017) Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. *J Genet Eng Biotechnol* 15: 369–377.
- Sharma, S., Kanwar, S.S. (2014) Organic solvent tolerant lipases and applications. *Sci World J*. 2014: 1-15.
- Sharma, R., Oberoi, H. S., Dhillon, G.S. (2016) Fruit and Vegetable Processing Waste. *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production*, 23–59.
- Shukla, P., Garai, D., Zafar, M, Gupta, K., Shrivastava, S. (2007). Process parameters optimization for lipase production by *Rhizopus oryzae* kg10 under submerged fermentation using response surface methodology. *J. Appl. Sci. Environ. Sanit*, 2:93-103.
- Silva, C. R. (2006) *Otimização do meio de cultura a base de soro de leite e água de maceração de milho para produção de proteases por Bacillus sp SMIA-2*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense. 50p.
- Singh, B., Satyanarayana, T. (2008) Phytase production by *Sporotrichum thermophilein* a cost-effective cane molasses medium in submerged fermentation and its application in bread. *Journal of Applied Microbiology*, 105: 1858–1865.
- Spigno, G., Marinoni, L., Garrido, G.D. (2017) State of the art in grape processing by-products *Handbook of Grape Processing By-Products*, 1-27.
- Soares, M.M.C.N., Silva, R., Gomes, E. (1999) Screening of bacterial strains for

pectinolitic activity: characterizations of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, 30: 299-303.

Sreelatha, B., Rao, V.K., Kumar, R.R., Girisham, S., Reddy, S.M. (2017) Culture conditions for the production of thermostable lipase by *Thermomyces lanuginosus*. *University Journal of Basic and Applied Sciences*, 6: 87- 95.

Stergiou, P.Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L.G., Hatziloukas, E., Afendra, A., Pandey, A., Papamichael, E. M. (2013) Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnol Adv.* 31: 1846–1859.

Stojceska, V., Ainsworth, P. (2008) The effect of different enzymes on the quality of high-fibre enriched brewer's spent grain breads. *Food Chem*, 110:865–872.

Sun, Q., Wang, H., Zhang, H., Luo, H., Shi, P., Bai, Y., Lu, F., Yao, B., Huang, H. (2016) Heterologous production of an acidic thermostable lipase with broad-range pH activity from thermophilic fungus *Neosartorya fischeri* P1. *J Biosci Bioeng*, 122: 539–544.

Sun, Y., Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83: 1–11.

Tacin, M.V., Massi, F.P., Fungaro, M.H.P., Teixeira, M.F.S., Paula, A.V. de, Santos-Ebinuma, V.D (2019). Biotechnological valorization of oils from agro-industrial wastes to produce lipase using *Aspergillus* sp from Amazon. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*,17: 369–378.

Tayyab, M., Rashid, N., Akhtar, M. (2011) Isolation and identification of lipase producing thermophilic *Geobacillus* sp. SBS-4S: Cloning and characterization of the lipase. *J Biosci Bioeng*, 111: 272–278.

Tellechea, F.R.F. (2015) *Torta de filtro de cana-de-açúcar e NPK na biorremediação em solos contaminados com óleo diesel*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 75p.

- Teles, A.S.C., Chavéz, D.W.H., Oliveira, R.A., Bon, E.P.S., Terzi, S.C., Souza, E.F., Tonon, R.V. (2018) Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds. *Food Research International*. doi:10.1016/j.foodres.2018.10.083.
- Thabet, H.M., Pasha, C., Ahmed, M.M., Linga, V.R. (2012) Isolation of Novel Lipase Producing *Sporobolomyces salmonicolor* OVS8 from Oil Mill Spillage and Enhancement of Lipase Production. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 5(4):301–306.
- Treichel, H., Oliveira, D. de, Mazutti, M.A., Di Luccio, M., Oliveira, J.V. (2010) A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol*. 3:182–196.
- Tozatti, P., Rigo, M., Bezerra, J.R.M.V., Córdova, K.R.V., Teixeira, A.M. (2013) Utilização de resíduo de laranja na elaboração de biscoitos tipo cracker. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, 15:135-150.
- Uppada, S.R., Akula, M., Bhattacharya, A., Dutta, J.R. (2017) Immobilized lipase from *Lactobacillus plantarum* in meat degradation and synthesis of flavor esters. *J Genet Eng Biotechnol*, 15: 331-334.
- Veerapagu, M., Sankara, N. A., Ponmurugan, K., Jeya, K. R. (2013) Screening selection identification production and optimization of Bacterial Lipase from oil spilled soil. *Asian Journal of Pharmaceutical Clinical Research*, 6: 62–67.
- Venkatesh, M., Pushpalatha, P.B., Sheela, K.B., Girija, D. (2009) Microbial pectinase from tropical fruit wastes. *J. Trop. Agr*, 47(1):67–69.
- Ventura-Sobrevilla, J., Boone-Villa, D., Rodriguez, R., Martinez-Hernandez, J.L., Aguilar, C.N. (2015) Microbial biosynthesis of enzymes for food applications. *Improv Tailoring Enzym Food Qual Funct*, 85–99.
- Verger, R. (1997) “Interfacial activation” of lipases: Facts and artifacts. *Trends Biotechnol*, 15: 32–38.
- Villeneuve, P. (2003) Plant lipases and their applications in oils and fats modification. *Eur J Lipid Sci Technol*, 105: 308–317.
- Wong, L.Y., Saad, W.Z., Mohamad, R., Tahir, P.M. (2017). Optimization of cultural

conditions for polygalacturonase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* R6 capable of retting kenaf. *Industrial Crops and Products*, 97: 175–183.

Xiaoyan, L., Xinjun, Y., Jinshun, L., Jiaying, X., Jun, X.; Zhen, W.; Tong, Z.; Yuanfang, D. (2017) A cost-effective process for the coproduction of erythritol and lipase with *Yarrowia lipolytica* M53 from waste cooking oil. *Food and Bioproducts Processing*, 103: 86-94.

Zaid, A. N., Zohud, N., E'layan, B., Aburadi, T., Jaradat, N., Ali, I., Abu Zaaror, Y. (2017). Pharmacodynamic testing and new validated HPLC method to assess the interchangeability between multi-source orlistat capsules. *Drug Design, Development and Therapy*, 11: 3291–3298.

Zheng, X., Wu, N., Fan, Y. (2012) Characterization of a novel lipase and its specific foldase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26. *Process. Biochem*, 47:643–650