

Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão

Microbiological Production of Enzymes: a Review

DOI:10.34117/bjdv7n1-624

Recebimento dos originais: 13/12/2020

Aceitação para publicação: 22/01/2021

Diane Rigo

Mestranda em Engenharia de Alimentos

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim
Endereço: Av. Sete de Setembro, 1621 – Bairro Fátima, Erechim - RS, 99709-910,
RS/Brasil
E-mail: dianerigo@hotmail.com

Luana Gayeski

Mestranda em Engenharia de Alimentos

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim
Endereço: Av. Sete de Setembro, 1621 – Bairro Fátima, Erechim - RS, 99709-910,
RS/Brasil
E-mail: luanagayeski13@gmail.com

Gabriela Albuquerque Tres

Mestranda em Engenharia de Alimentos

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim
Endereço: Av. Sete de Setembro, 1621 – Bairro Fátima, Erechim - RS, 99709-910,
RS/Brasil
E-mail: gabriela-tres@hotmail.com

Fernanda DalMaso Camera

Professor do Curso de Fisioterapia

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim
Endereço: Av. Sete de Setembro, 1621 – Bairro Fátima, Erechim - RS, 99709-910,
RS/Brasil
E-mail: fernandadalmasocamera@gmail.com

Jamile Zeni

Professor do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Engenharia de Alimentos

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim
Endereço: Av. Sete de Setembro, 1621 – Bairro Fátima, Erechim - RS, 99709-910,
RS/Brasil
E-mail: jamilezeni@uricer.edu.br

Eunice Valduga

Professor do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Engenharia de Alimentos
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim
Endereço: Av. Sete de Setembro, 1621 – Bairro Fátima, Erechim - RS, 99709-910,
RS/Brasil
E-mail: veunice@uricer.edu.br

Rogério Luis Cansian

Professor do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Engenharia de Alimentos
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim
Endereço: Av. Sete de Setembro, 1621 – Bairro Fátima, Erechim - RS, 99709-910,
RS/Brasil
E-mail: cansian@uricer.edu.br

Geciane Toniazzo Backes

Professora do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Engenharia de Alimentos
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim
Endereço: Av. Sete de Setembro, 1621 – Bairro Fátima, Erechim - RS, 99709-910,
RS/Brasil
E-mail: gtoniazzo@uricer.edu.br

RESUMO

A produção de enzimas a partir de microrganismos possui extensa aplicação na indústria alimentícia buscando a melhoria do processo de produção e outros componentes relacionados. As lipases produzidas por microrganismos têm ganhado um enorme interesse industrial devido à sua versatilidade, maior rendimento e produção independente da estação do ano. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica da produção microbiana de enzimas, com foco principalmente em lipases devido a sua importância no meio industrial, identificando quais os principais microrganismos empregados, forma de produção, métodos de isolamento, purificação e aplicação. O trabalho foi desenvolvido por meio de pesquisa bibliográfica realizada em artigos científicos, dissertações e teses localizados nas bases de dados online e portais de pesquisa. Este estudo mostrou que a produção de enzimas por microrganismos vem sendo muito estudada indicando diferentes posteriores aplicações para a indústria. A possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais para a produção microbiana de enzimas também é uma boa alternativa para sanar problemas ambientais, além de envolver baixos custos no processo. Para a produção de lipases, existem inúmeros microrganismos que podem atender esta procura, no entanto, os fungos se destacam, sendo os maiores produtores de lipase microbiana.

Palavras-chave: Produção enzimática, Microrganismos, Lipases.

ABSTRACT

The production of enzymes from microorganisms has extensive application in the food industry seeking to improve the production process and other related components. The

lipases produced by microorganisms have gained enormous industrial interest due to their versatility, higher yield and production independent of the season. The objective of this work was to carry out a bibliographic review of the microbiological production of enzymes, focusing mainly on lipases due to their importance in the industrial environment, identifying which are the main microorganisms used, production method, isolation, purification and application methods. The work was developed through bibliographic research carried out on scientific articles, dissertations and theses located in online databases and research portals. This study showed that the production of enzymes by microorganisms has been extensively studied, indicating different later applications for the industry. The possibility of using agro-industrial residues for the microbial production of enzymes is also a good alternative to solve environmental problems, in addition to involving low costs in the process. For the production of lipases, there are numerous microorganisms that can meet this demand, however, fungi stand out, being the largest producers of microbial lipase.

Keywords: Enzymatic production, Microorganisms, Lipases.

1 INTRODUÇÃO

A produção de enzimas a partir de microrganismos possui extensa aplicação na indústria alimentícia buscando a melhoria do processo de produção, e outros componentes relacionados, como sabor, aroma, cor, textura, aparência, vida de prateleira, valor nutritivo, etc. (Srivastava, 2019).

Segundo Papadaki et al. (2020), o mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 7,1 bilhões em 2017 e deverá chegar a US\$ 10,5 bilhões em 2024, com uma taxa de crescimento anual de 5,7% de 2018 a 2024, sendo que a Europa foi responsável por 1/3 de produção global de enzimas em 2017 e no mesmo ano, estimou-se que cerca de 70% da quota de mercado de enzimas era produzida por microrganismos.

Microrganismos industrialmente relevantes, como *Bacillus licheniformis*, *Candida cylindracea*, *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei* são produtores de proteases, lipases e celulases, respectivamente, muito empregadas na indústria (Weiss, 2020).

Em relação às proteases microbianas, estas têm sido utilizadas na preparação de hidrolisados de proteína de alto valor, podendo ser usada em formulações de alimentos infantis, produtos alimentares terapêuticos específicos, fortificantes de sucos e refrigerantes e como aditivos alimentares funcionais (Aguilar; Sato, 2017). Já as pectinases podem ser aplicadas nas indústrias de alimentos e bebidas em vários processos,

como clarificação de suco, produção de vinho e extração de óleo vegetal (Murugan et al., 2020). As amilases podem atuar na hidrólise do amido produzindo xaropes de frutose e glicose, e, também na produção de itens de panificação (Suriya et al., 2016). As lipases são capazes de modificar as propriedades de lipídios, produzir sabor e aroma modificando a estrutura por inter ou transesterificação obtendo produtos de maior valor nutricional, facilitam a remoção de gordura de produtos de carne e peixe, entre outros (Mehta et al., 2021).

Na área de biocombustíveis, altas taxas de produção de biodiesel e atividade catalítica têm sido relatadas a partir de lipases provenientes de diferentes microrganismos, como *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Cryptococcus* sp., *Trichosporon asahii* e *Yarrowia lipolytica*. Além disso, nos últimos 20 anos, as lipases microbianas, especificamente, são usadas para catalisar reações de metanólise (Budžaki et al., 2018).

Outro exemplo de microrganismos produtores de enzimas são os fungos de podridão branca, os quais produzem enzimas oxidantes (por exemplo, lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase) e enzimas hidrolíticas (xilanases e celulases) através de resíduos agrícolas, sendo essas enzimas utilizadas em diversos processos industriais, e conseqüentemente, sua produção aumentou nas últimas décadas com uma receita de US\$ 8 bilhões (Lopes et al., 2020).

Os fungos filamentosos possuem uma capacidade grande de secretar um pool de proteínas que motiva o seu intensivo uso na produção de enzimas industriais. Entre os microrganismos mais estudados e utilizados para a produção de enzimas para hidrólise da parede celular vegetal estão cepas mutantes de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*. No entanto, muitas espécies de *Penicillium* foram relatadas para produzir sistemas enzimáticos com desempenho superior do que *T. reesei* e *A. niger*. Entre as espécies de *Penicillium*, *P. echinulatum* tem sido foco de atenção devido ao seu potencial para produzir grandes quantidades de celulases sendo considerada uma cepa promissora para hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica e, conseqüentemente, para a indústria de etanol de segunda geração (Schneider et al., 2018).

As lipases (triacilglicerol acilidrolases, EC 3.1.1.3) estão entre os biocatalisadores mais valorizados no campo da biotecnologia e podem ser utilizadas em indústrias de alimentos, detergentes, têxteis, farmacêuticos, energia e cosméticos. A necessidade constante de lipases nos processos industriais a torna o terceiro maior grupo de enzimas

com base no valor de mercado, depois das proteases e carboidrases (Phukon et al., 2020). Algumas reações orgânicas das lipases incluem acidólise, hidrólise, epoxidação, esterificação, alcoólise, aminação e transesterificação (Quayson et al., 2020).

Segundo Patel et al. (2020), as lipases produzidas por microrganismos têm ganhado um grande interesse industrial devido à sua versatilidade, maior rendimento, bem como à produção independente da estação do ano em comparação com as produções animais e vegetais. Além disso, a produção de lipases microbianas é fácil e econômica trazendo benefícios adicionais.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica da produção microbiológica de enzimas, principalmente de lipases devido a sua importância no meio industrial, identificando quais os principais microrganismos produtores, métodos de isolamento, processo de produção, purificação e aplicação.

2 METODOLOGIA

O presente artigo de revisão foi desenvolvido por meio de pesquisa bibliográfica realizada em artigos científicos, dissertações e teses localizados nas bases de dados online/portais de pesquisa: Scielo (Scientific Electronic Library Online), Science Direct e Google Acadêmico, publicados do ano de 2005 a 2021.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS

Mais da metade das enzimas industriais são produzidas por leveduras e fungos filamentosos e cerca de 30% por bactérias. Apenas 8% são produzidos por animais e 4% por plantas. A aplicação industrial de enzimas tornou-se possível devido aos esforços iniciais de Jokichi Takamine (1894, 1914) e de Boidin e Effront (1917), que cultivaram enzimas de fungos e bactérias, respectivamente, em escala industrial. Essas fontes são economicamente favoráveis, pois o seu cultivo simples não envolve quaisquer restrições relacionadas com tempo e espaço em comparação com outras fontes. As tecnologias avançadas permitem que os genomas de microrganismos sejam sequenciados de maneira muito eficiente e permite que muitas novas sequências de genes que codificam variantes de enzimas sejam também identificadas (Srivastava, 2019). A Tabela 1 apresenta

exemplos de microrganismos produtores de enzimas, assim como a fonte de isolamento, método de produção e possível aplicação.

Tabela 1: Levantamento de trabalhos que apresentam a produção de enzimas pela fonte microbiana.

| Microrganismo produtor | Fonte de isolamento/ATCC | Método de produção | Aplicação | Referências |
|--|--|--|---|----------------------------------|
| Lipases | | | | |
| <i>Penicillium</i> | Efluente de laticínios | Fermentação submersa | Tratamento de efluentes industriais | Roveda; Hemkemeier; Colla (2010) |
| <i>Nocardiosis</i> sp. | Ambiente salino e alcalino | In vitro (utilizando diferentes meios) | Atividade lipolítica sobre o palmitato de p-nitrofenil | Aziz et al. (2020) |
| <i>Malbranchea cinnamomea</i> S168 | Centro de Culturas Microbiológicas da China (nº de acesso 6022) | Fermentação em Batelada Alimentada | Produção de sabor de gordura do leite lipolisado e biodegradação de ésteres | Duan et al. (2019) |
| <i>Haloferax lucentensis</i> GUBF-2 MG076078 | Solução salina, ambientes não salinos e invertebrados da Índia Fornecido pela Coleção de Culturas da Universidade Federal do Amazonas, DPUA, AM, Brasil | Fermentação submersa | Bioativo para produção de detergentes | Gaonkar; Furtado (2020) |
| <i>Aspergillus</i> sp. DPUA 26109 | Fornecido pela Coleção de Culturas da Universidade Federal do Amazonas, DPUA, AM, Brasil | Fermentação submersa | Hidrólise de óleos de resíduos agroindustriais | Tacin et al. (2018) |
| Proteases | | | | |
| <i>Bacillus subtilis</i> FBL-1 (KCCM 43196) | Solo | In vitro (extrato de levedura, KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄) | Hidrolise de Caseína (liberação de tirosina) | Si et al. (2018) |
| <i>Lentinus crinitus</i> (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 | Cedida pela Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas | Fermentação Submersa | Uso potencial em indústrias de alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos | Magalhães et al. (2019) |
| <i>Streptomyces</i> sp. Al-Dhabi-82 | Solo | Fermentação submersa utilizando meio basal | Hidrolise de pena de frango | Al-Dhabi et al. (2019) |
| <i>Exiguobacterium profundam</i> sp. | Solo | In vitro (Agar Leite Desnatado) | Atividade de gelatinase | Sudha et al. (2018) |

| | | | | |
|-------------------------------------|---|--|--|--------------------------------------|
| <i>Sapindus saponaria</i> Br | Plantas do cerrado | Fermentação Submersa | Atividade queratinolítica, colagenolítica, anticoagulante no leite; Uso em detergentes para roupas | Werneck (2016) |
| Pectinases | | | | |
| <i>Bacillus</i> sp. | Solo de resíduos de frutas coletado dentro e ao redor da área de um mercado na Índia | Fermentação submersa | Avaliação da atividade pectinolítica | Murugan et al. (2020) |
| <i>Aspergillus ibericus</i> | Resíduos sólidos de uvas, laranjas e pêssegos coletados de uma indústria de processamento de frutas da Índia. | Otimização do processo mediante tratamento estatístico | Tratamento de água residual contendo pectina | Mahesh et al. (2016) |
| <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642 | Resíduos de casca de arroz e feno | Fermentação em Estado Sólido | Hidrólise | Teixeira et al. (2018) |
| <i>Aspergillus</i> spp. LEMI 15 | Amostras de manípueira fresca | Fermentação em Estado Sólido | Atividade pectinolítica | Rêgo et al. (2019) |
| <i>Candida</i> | Efluentes têxteis | Fermentação em Estado Sólido | Bio-limpeza do Algodão | Aggarwal; Dutta; Sheikh (2020) |
| Celulases | | | | |
| <i>Trichoderma reesei</i> | RUT C-30 | Fermentação em estado sólido (farelo de trigo) | Hidrólise de palha de sorgo para gerar açúcares fermentáveis e para produção de bioetanol | Idris et al. (2017) |
| <i>Penicillium</i> sp. | Solo poluído com efluentes | Fermentação submersa | Potencial para aplicações biotecnológicas | Prasanna; Gamanjaneyul; Reddy (2016) |
| <i>Aspergillus niger</i> RCKH-3 | Material orgânico em decomposição | Fermentação em estado sólido (farelo de trigo) | Sacarificação para aplicações de biocombustíveis | Hemansi et al (2018) |
| <i>Pseudomonas</i> sp. LKR-1 | Solo | Fermentação in vitro | Tratamento de resíduos sólidos agrícolas em regiões frias | Sun et al. (2019) |
| <i>Trichoderma reesei</i> NRRL 3652 | Resíduos agroindustriais (casca de arroz e feno) | Fermentação em Estado Sólido | Hidrólise da celulose | Teixeira et al. (2018) |

Existem inúmeros estudos para a produção microbiana de enzimas, incluindo diversos tipos de microrganismos que podem ser isolados de ambientes diversos (Tabela 1). Também é possível observar que o fungo *Aspergillus* destaca-se pela capacidade de produzir inúmeras enzimas, tornando-o um dos principais microrganismos de interesse industrial.

3.2 PROCESSO DE PRODUÇÃO

O efeito da composição do meio, temperatura, pH, umidade conteúdo, concentração de inóculo e porosidade do substrato são de importância essencial para o desenvolvimento de bioprocessos. Em um sentido geral, o aumento da produtividade está relacionado à otimização do meio (Rigo et al., 2009).

As atividades agrícolas e industriais de alimentos geram grandes volumes de resíduos a cada ano, onde os setores da agricultura, silvicultura e pesca, produziram cerca de 21 milhões de toneladas de resíduos na União Europeia em 2018. Essa produção de resíduos aumentará nas próximas décadas devido ao crescimento da população mundial e o conseqüente aumento da produção de alimentos. O descarte desses materiais é de grande importância e, quando realizado de forma inadequada, pode gerar impactos ambientais. Neste sentido, a biotecnologia pode ser uma excelente ferramenta para transformar os resíduos e subprodutos agroindustriais em matérias-primas para a produção de produtos de valor agregado (Leite et al., 2020).

Segundo Salazar et al. (2019), os resíduos agroindustriais se destacam como substratos ideais para a fermentação microbiana, devido à sua riqueza orgânica, baixo custo e ampla disponibilidade. Resíduos agrícolas vindos da produção de arroz, trigo, sementes oleaginosas e grãos estão entre os mais abundantes subprodutos agrícolas no mundo. Além disso, o uso de subprodutos agrícolas apresenta melhor balanço energético e um menor impacto ambiental do que substratos puros.

Alguns resíduos orgânicos também podem auxiliar na fermentação da produção de enzimas, como suportes que atuam como uma barreira física que impede a livre mobilidade das moléculas enzimáticas e são os principais responsáveis pelo desempenho do sistema imobilizado (da Silva; Ernandes; Cruz, 2020).

A utilização de resíduos agroindustriais baratos como substrato na fermentação em estado sólido (FES) vem ganhando mais atenção devido à maior atividade em relação

à fermentação submersa (FSm), no entanto, promover uma mistura desses substratos torna-se viável para o crescimento microbiano na FES. A mistura de substratos pode fornecer uma melhor área de superfície e acessibilidade da nutrição ao microrganismo (Mandari et al., 2020).

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como o processo de crescimento microbiano em um substrato sólido sem água livre aparente, muito utilizado para a produção de enzimas microbianas devido às vantagens econômicas e biotecnológicas sobre a fermentação submersa convencional. Entre as principais vantagens, está a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais sólidos (por exemplo, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de arroz e farelo de soja, entre outros) que servem como fonte de carbono e energia para o crescimento dos microrganismos, contribuindo também para uma destinação adequada desses resíduos (Aita et al., 2019).

Vários estudos têm sido realizados com fungos filamentosos para produção de enzimas através de fermentação em estado sólido (FES) em resíduos de lignocelulose e esses microrganismos apresentaram bom crescimento, pois esses substratos são muito semelhantes aos presentes em seus *habitats*. A maioria desses estudos descreveu a produção de celulasas, hemicelulasas e ligninases por espécies fúngicas isoladas. No entanto, nem todas as enzimas necessárias foram produzidas em altas concentrações por uma única espécie de fungo. Como uma alternativa, poderia ser feita a utilização de uma associação fúngica, com duas ou mais espécies, resultando em uma estratégia interessante para aumentar a produção de coquetéis enzimáticos com alto potencial catalítico (Rodrigues et al., 2020).

Já as vantagens do uso da fermentação submersa (FSm) em relação a FES envolvem os processos que a FES ainda necessita, como por exemplo, um escalonamento adequado quanto à purificação dos produtos finais e biomassa, uma vez que o substrato é caracterizado por um nível de pH relativamente alto (7,5 e 8,1), o que pode representar um fator de limitação em culturas de fungos, normalmente estabelecidos em ambiente ácido. A FSm através da sua diluição, juntamente com os efeitos de tampão podem evitar a alteração do pH, mantendo assim um ambiente adequado às condições exigidas pelos microrganismos. Além disso, a turbulência aprimorada melhora a acessibilidade do substrato (Musatti et al., 2017).

3.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

Os protocolos de extração de enzimas são projetados com base no local de produção da enzima na célula microbiana. Para extração da enzima intracelular, as células são rompidas por diferentes mecanismos como sonicação e métodos enzimáticos (lisozima, quitina, glucanases), seguido por centrifugação em alta rotação. O sobrenadante obtido é utilizado como amostra para purificação enquanto a enzima extracelular secretada no próprio meio não requer nenhum método de rompimento celular. Toda a cultura é centrifugada e o sobrenadante obtido é utilizado como amostra para purificação. O sobrenadante obtido é, então, precipitado utilizando o método de precipitação de sulfato de amônio, seguido de purificação usando o método cromatográfico mais eficiente entre as técnicas de separação. A seleção de técnicas depende das características e propriedades da enzima a ser purificada, como: tamanho (cromatografia de filtração em gel); carga (cromatografia de troca iônica) e afinidade de ligação (cromatografia de afinidade); e hidrofobicidade (cromatografia de interação hidrofóbica). Pode-se purificar a enzima de interesse de uma mistura complexa de proteínas/extrato celular, escolhendo o número mais eficiente e mínimo de técnicas de purificação para atingir o melhor nível de pureza (Srivastava, 2019).

3.4 PRODUÇÃO MICROBIOLÓGICA DE LIPASES

As lipases são extremamente diferentes em suas características e são onipresentes em plantas, animais e microrganismos. Enzimas produzidas por fontes microbianas ganharam muita atenção industrialmente em relação a que aquelas derivadas de plantas e animais, devido às suas características e capacidade funcional em condições extremas, estabilidade em solvente orgânico, quimioseletividade, enantioseletividade e não requerem cofatores. Muitos microrganismos são conhecidos como potenciais produtores de lipases, incluindo bactérias, fungos e leveduras (Bharathi; Rajalakshmi, 2019).

3.4.1 Lipases Bacterianas

As fontes bacterianas produtoras de lipases comerciais mais comuns incluem: *Bacillus* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Staphylococcus* sp. e *Burkholderia* sp. As lipases bacterianas são classificadas em oito famílias e as propriedades específicas variam dependendo do grupo ao qual pertencem, com pH e temperatura ideais específicos.

Geralmente, as lipases de *Pseudomonas* spp. têm pH ideal neutro ou alcalino, com exceção de algumas lipases ácidas ótimas produzidas por cepas de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas cepacia*. Curiosamente, lipases psicrófilas também foram relatadas de *Pseudomonas fluorescens* com atividade ótima a 20 °C. A termoestabilidade e a adaptação ao frio são altamente desejáveis em lipases para serem passíveis de aplicações industriais. Enzimas com ampla janela de temperatura, especialmente com atividade em temperatura mais baixa, são demandadas por alguns dos bioprocessos nas indústrias de conversão de biomassa, fermentação e detergentes, onde economizam a conversão de energia e evitam a contaminação com microrganismos mesófilos (Phukon et al., 2020).

3.4.2 Lipases Fúngicas

As cepas de fungos filamentosos são conhecidas por serem potenciais produtoras de lipase com notáveis propriedades catalíticas únicas que são muito importantes para várias aplicações comerciais. Os gêneros *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp. são os principais fungos produtores de lipase comercial e industrialmente importantes. A produção de lipase por fungos varia de acordo com a cepa e composição do meio de crescimento, como fontes de carbono e nitrogênio (Bharathi; Rajalakshmi, 2019).

3.4.3 Lipases de Levedura

Alguns estudos foram realizados sobre o potencial de produção de lipase por leveduras psicrófilas ou psicrotolerantes, como *Candida antartica*, *Cryptococcus victoriae*, *Mrakia psychrophila*, *Leucosporidiella creatinivora*, *Leucosporidium scottii*, *Rhodotorula glacialis* e *R. larynges* (Taskin et al., 2016). A literatura mostra que as leveduras *Candida utilis*, *Candida rugosa*, *Rhodotorula* sp., *Yarrowia* sp. e *Pichia* sp. são as melhores produtoras de lipase e a *Candida* sp. é a que apresenta maior potencial da categoria de leveduras (Bharathi; Rajalakshmi, 2019).

A ampla aplicação tecnológica e a especificidade das lipases despertam um grande interesse na busca por novas cepas de microrganismos produtores dessa enzima, assim como a otimização das condições de cultivo, aliada à escolha de linhagens adequadas de microrganismos, podendo levar a maior produção de enzimas, além de reduzir custos, o

que é extremamente vantajoso para sua comercialização (Costa et al., 2020). Neste sentido, podemos encontrar diversos trabalhos que apresentam desde a produção do microrganismo, até o tipo de reação ou a aplicação da lipase produzida, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Relação de trabalhos que apresentam a produção de lipase por microrganismos.

| Microrganismo | Tipo de Microrganismo | Meio de produção | Aplicação/Reação | Referências |
|--|-------------------------------------|---|--|--------------------------------|
| <i>Yarrowia lipolytica</i> | Levedura (isolada) | Resíduo agroindustrial de manga | Hidrólise | Pereira et al. (2019) |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> HL25 | Levedura adaptada ao frio (isolada) | Azeite de oliva de fritura residual | Hidrólise | Taskin et al. (2016) |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> | Levedura (comercial) | Sebo de frango | Produção de biodiesel | Radha et al. (2020) |
| <i>Candida rugosa</i> e <i>Geotrichum candidum</i> | Levedura e fungo (comercial) | Melaço de soja | Hidrólise | de Moraes Júnior et al. (2016) |
| <i>Pseudomonas helmanticensis</i> HS6 | Bactéria (isolada) | Solo montanhoso de estado de Sikkim localizado no Himalaia | Produção de Detergente | Phukon et al. (2020) |
| <i>Pseudomonas brenneri</i> | Bactéria (isolada) | Meio LB enriquecido com azeite de oliva | Síntese de biodiesel | Priyanka et al. (2020) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Bactéria (isolada) | Meio LB ou TB suplementado com diferentes concentrações de glicerol e hidrolisado de pena de frango | Hidrólise | Wu et al. (2020) |
| <i>Acinetobacter sp.</i> AU07 | Bactéria (isolada) | Meio nutriente com óleos vegetais | Biorremediação para tratar águas residuais contaminadas com óleos. | Gururaj et al. (2016) |
| <i>Rhizomucor miehei</i> | Fungo (comercial) | Torta e fibra de palma | Produção de monoglicerídeos diglicerídeos | Collaço et al. (2021) |
| <i>Aspergillus oryzae</i> (NCIM 1212) e <i>Aspergillus japonicus</i> (MTCC No. 1975) | Fungos (comercial) | Torta de mamona | - | Jain; Naik (2018) |
| <i>Aspergillus ibericus</i> | Fungo (comercial) | Tortas de óleo de subprodutos agroindustriais extraídos do óleo das sementes | Reações de esterificação | Oliveira et al. (2017) |
| <i>Thermomyces lanuginosus</i> | Fungo termofílico (isolado) | Fermentação submersa | Misturas racêmicas, hidrólise | Sreelatha et al. (2017) |
| <i>Fusarium incarnatum</i> | Fungo (isolado) | Farelo de trigo | Degradação de óleo de cozinha residual | Joshi et al. (2019) |

| | | | | |
|-----------------------------------|-------------------|--|------------------------------------|-----------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> MTCC 872 | Fungo (comercial) | Bolo de semente de algodão, casca de grama vermelha, vagens de <i>algaroba</i> | Transesterificação | Mandari et al. (2020) |
| <i>Fusarium solani</i> | Fungo (isolado) | Efluente de fábrica de óleo de palma | Esterificação e transesterificação | Geoffry; Achur (2018) |

As lipases fúngicas surgiram como uma das principais enzimas produzidas (Geoffry; Achur, 2018). Este fato condiz com a grande quantidade de trabalhos encontrados com a produção de lipase fúngica, podendo ser justificado pela possibilidade de variação dos componentes do meio de crescimento e por alguns motivos como: os fungos podem acumular até 80% de lipídios e produzir alguns ácidos graxos com valor agregado, possuem bons perfis lipídicos para a fabricação de biodiesel de alta qualidade e podem utilizar uma boa variedade de fontes de carbono para a produção de lipídios (Jambulingam et al., 2019).

Em relação ao isolamento de lipases, Rigo et al. (2009), isolaram e identificaram o microrganismo *Penicillium* sp. de amostras de farelo de soja em placas de Petri usando ágar de dextrose de batata (PDA), mantidos a 30 °C. A triagem foi realizada por fermentação em farelo de soja e a cepa foi identificada como boa produtora de lipase.

Griebeler et al. (2009) isolaram os microrganismos *Penicillium* and *Aspergillus*, produtores de lipase de diversas fontes como solo, azeite, queijo, extrato de tomate, óleo de soja, leite creme, carne, farelo de soja e meios de cultura contaminados. O isolamento foi feito em placas de Petri usando meio de ágar batata dextrose (PDA) em 30 °C. Todas as culturas de estoque foram armazenadas a -10 °C.

No trabalho realizado por Gururaj et al. (2016) os microrganismos de *Acinetobacter* sp., que são produtores de lipase foram isolados de uma unidade de destilaria. A amostra líquida (1 mL) foi suspensa em 9 mL de água esterilizada, diluída em série e espalhada em meio seletivo contendo óleo de gergelim como única fonte de carbono e incubada a 37 °C por 24 h. Este meio seletivo continha 2,0 g/L de peptona, 5,0 g/L de NaCl, 20 (v/v) óleo de gergelim (emulsificado com 0,01% de Triton X-100) e 15,0 g/L de ágar bacteriológico. Já no trabalho de Pryanka et al. (2018), amostras de solo foram coletadas nas em vários locais das montanhas de Wicklow na Irlanda e colocadas em meios enriquecidos por 72 horas a 28 °C, 200 rpm.

A purificação de lipases microbianas pode envolver várias etapas, dependendo da natureza da mesma (intracelular ou extracelular). Em ambos os casos, as proteínas produzidas são posteriormente salgadas por técnicas de precipitação usando sulfato de amônio. Além do precipitado a proteína é submetida a técnicas de diálise e cromatografia. A escolha das técnicas de cromatografia utilizadas para purificar lipases difere com base na fonte de microrganismos e tamanho das proteínas, principalmente quando a técnica empregada for a cromatografia em coluna. As frações brutas obtidas são analisadas quanto à presença de enzimas por vários protocolos de ensaio, e outras técnicas de separação podem ser aplicadas, como troca iônica, DEAE-sepharose e cromatografia de filtração em gel (Bharathi; Rajalakshmi, 2019).

Phukon et al. (2020) realizaram a purificação da lipase extracelular através da eliminação de células, precipitação, dessalinização e cromatografia. O extrato enzimático de *P. helmanticensis* HS6 foi precipitado por sulfato amônio (20-50%), dialisado e submetido a cromatografia de troca iônica em uma coluna DEAE-Sepharose. Após a cromatografia, a lipase purificada resultou em uma atividade específica de 3368 U/mg com uma purificação de 18,78 vezes e um rendimento de 5,58%.

Gururaj et al. (2016) purificaram parcialmente a lipase de *Acinetobacter* sp. AU07 (ASL) por precipitação com sulfato de amônio (30-60% de saturação) e, posteriormente, foi realizada a purificação até a homogeneidade por cromatografia de troca aniônica. Houve um rendimento global de 36,04%, com uma purificação de 2,2 vezes e uma atividade específica de 83,47 U/mg.

Em outro trabalho encontrado na literatura, a purificação parcial da lipase foi realizada por um processo de duas etapas. A etapa inicial foi realizada através de uma técnica pouco usada, que é a precipitação alcalina (pH 9,0), que removeu algumas proteínas contaminantes da preparação da lipase. Uma segunda etapa de purificação foi realizada através da cromatografia de troca aniônica (pH 8,5) que eluiu a lipase parcialmente purificada, em um tampão de eluição contendo NaCl 750 mM a pH 8,5. O aumento do pH para pH 9,0 desencadeou a precipitação do dialisado, que não pode ser usado para purificação em resinas cromatográficas. Portanto, para evitar a precipitação e permitir o uso do dialisado após precipitação alcalina para cromatografia, o pH do dialisado foi reduzido para 8,5. Após a o processo de purificação, um resultado de

atividade específica de 3,18 IU/mg da lipase foi alcançado, com um rendimento geral de 56,89% (Priyanka et al., 2020).

Em relação às aplicações das lipases, a alta versatilidade destas enzimas permite suas aplicações em inúmeros setores industriais, pois estes biocatalisadores possuem uma capacidade de desempenhar um papel químico e biológico muito específico, tornando-as cada vez mais populares nesses campos (Bharathi; Rajalakshmi, 2019).

Na indústria de alimentos as lipases costumam ter múltiplas funções, atuando na melhoria da qualidade do pão por meio de mudanças nos lipídios da farinha; no realce do sabor da manteiga, queijo e margarina; na síntese de lipídios estruturados para alimentos infantis. Além disso, as lipases são úteis para aumentar a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados em óleos vegetais e na melhoria da digestibilidade dos lipídios naturais (Navvabi et al., 2018).

A indústria têxtil também pode se favorecer da lipase removendo lubrificantes no tecido e melhorando o processo de tingimento. Já na indústria de detergentes, as lipases podem reduzir a carga do produto que vai para o meio ambiente, são biodegradáveis, não deixam resíduos nocivos e não tem impacto negativo sobre os processamentos de esgoto (Hasan; Shah; Hameed, 2006).

Budžaki et al. (2018) relatam que os processos enzimáticos para a produção de biodiesel possuem amplas vantagens em relação ao uso de processos químicos como: menor consumo de energia devido a temperaturas de reação mais amenas; possibilidade de utilização de óleos de diferentes fontes, bem como matéria-prima não convencional (resíduos de óleo de cozinha e óleo de microalgas), uma vez que tanto os triglicerídeos quanto os ácidos graxos livres são convertidos em biodiesel; não há geração de subprodutos indesejáveis; facilidade de separação e purificação dos produtos; há produção de alta qualidade de glicerol e nenhuma água residual é gerada.

4 CONCLUSÃO

Este trabalho mostra que a produção de enzimas por microrganismos vem sendo muito estudada e utilizada com o intuito de haver posteriores aplicações na indústria. Esta produção pode atender a alta demanda industrial, facilitando o grande uso em diferentes setores como, por exemplo, alimentação, farmacêutica e química.

A possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais para a produção microbiana de enzimas também é uma boa alternativa para sanar problemas ambientais, além de envolver baixos custos no processo.

Para a produção de lipases, uma das enzimas mais utilizadas pela indústria, existem inúmeros microrganismos que podem atender esta procura, fazendo com que se tenham diversas alternativas de produção enzimática, no entanto, os fungos se destacam, sendo os maiores produtores de lipase microbiana.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001 e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil (FAPERGS).

REFERÊNCIAS

- Aguilar, J. G. dos S.; Sato, H. H. (2017). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 10.1016/j.foodres.2017.10.044.
- Aita, B. C.; Spanemberg, S. S.; Schmaltz, S.; Zobot, G. L.; Tres, M. V.; Kuhn A, R. C.; Mazutti, M. A. (2019). Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agro industrial residues as substrates. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 7, 103193, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103193>.
- Aggarwal, R.; Dutta, T.; Sheikh, J. (2020). Extraction of pectinase from *Candida* isolated from textile mill effluent and its application in bio-scouring of cotton. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 17, 100291, <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100291>.
- Al-Dhabi, N. A.; Esmail, G. A.; Ghilan, A.-K. M.; Arasu, M. V.; Duraipandiyar, V.; Ponmurugan, K. (2019). Characterization and fermentation optimization of novel thermo stable alkaline protease from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-82 from the Saudi Arabian environment for eco-friendly and industrial applications. *Journal of King Saud University – Science*, <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.11.011>.
- Aziz, M. M. A.; Elgammal, E. W.; Ghitas, R. G. (2020). Comparative study on modeling by neural networks and response surface methodology for better prediction and optimization of fermentation parameters: Application on thermo-alkaline lipase production by *Nocardopsis* sp. strain NRC/WN5 *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 25, 101619, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101619>.
- Bharathi, D.; Rajalakshmi, G. (2019). Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 22, 101368, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101368>.
- Budžaki, S.; Miljić, G.; Sundaram, S.; Tišma, M.; Hessel, V. (2018). Cost analysis of enzymatic biodiesel production in small-scaled packed-bed reactors. *Applied Energy*, v. 210, p. 268–278, <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.11.026>.
- Collaço, A. C. A.; Aguiéiras, E. C. G.; Cavalcanti, E. D. C.; Freire, D. M. G. (2021). Development of an integrated process involving palm industry co-products for monoglyceride/diglyceride emulsifier synthesis: Use of palm cake and fiber for lipase production and palm fatty-acid distillate as raw material. *LWT - Food Science and Technology*, v. 135, 110039, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110039>.
- Costa, T. P.; Spencer, P. V. D.; Souza, M. J.; Rocha, A. C. P.; Nelson, D. L.; Pinto, N. A. V. D. (2020). Standardization of the cultivation of the isolated filamentous fungus A4 for lipase production. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba v. 6, n. 10, p.76404-76423, DOI:10.34117/bjdv6n10-168.

Da Silva, M. D.; Ernandes, F. M. P. G.; Cruz, C. H. G. (2020). Selection and isolation of fungi strains and the use of banana peel a support for lipases production. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 6, n. 7, p. 51310-51320, DOI:10.34117/bjdv6n7-685.

De Moraes Júnior, W. G.; Kamimura, E. S.; Ribeiro, E. J.; Costa Pessela, B. C.; Cardoso, V. L.; De Resende, M. M. (2016). Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. *Protein Expression and Purification*, v. 123, p. 26-34, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2016.04.001>.

Duan, X.; Xiang, M.; Wang L.; Yanc, Q.; Yanga, S.; Jianga, Z. (2019). Biochemical characterization of a novel lipase from *Malbranchea cinnamomea* suitable for production of lipolyzed milkfat flavor and biodegradation of phthalate esters. *Food Chemistry*, v. 297, 124925, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.199>.

Gaonkar, S. K.; Furtado, I. J. (2020). Valorization of low-cost agro-wastes residues for the maximum production of protease and lipase haloextremozymes by *Haloferax lucentensis* GUBF-2 MG076078. *Process Biochemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.10.019>.

Geoffry, K.; Achur, R. N. (2018). Optimization of novel halophilic lipase production by *Fusarium solani* strain NFCCL 4084 using palm oil mill effluent. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 16, p. 327–334, <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.04.003>.

Griebeler, N.; Polloni, A. E.; Remonato, D.; Arbter, F.; Vardanega, R.; Cechet, J. L.; Di Luccio, M.; De Oliveira, D.; Treichel, H.; Cansian, R. L.; Rigo, E.; E L. Ninow, J. L. (2011). Isolation and Screening of Lipase-Producing Fungi with Hydrolytic Activity. *Food Bioprocess and Technology*, v. 4, p. 578–586, DOI 10.1007/s11947-008-0176-5.

Gururaj, P.; Ramalingam, S.; Devi, G. N.; Gautam, P. (2016). Process optimization for production and purification of a thermostable, organic solvent tolerant lipase from *Acinetobacter* sp. AU07. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 647–657, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.04.002>.

Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235–251, doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.

Hemansi, R. G.; Kuhad, R. C.; Saini J. K. (2018). Cost effective production of complete cellulase system by newly isolated *Aspergillus niger* RCKH-3 for efficient enzymatic saccharification: Medium engineering by overall evaluation criteria approach (OEC). *Biochemical Engineering Journal*, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.01.019>.

Idris, A. S. O.; Pandey, A.; Rao, S.; Sukumaran, R. K. (2017). Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. *Bioresource Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.092>.

Jain, R.; Naik, S. N. (2018). Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: Production of lipase in solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 15, p. 181–184, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.06.010>.

Jambulingam, R.; Shalma, M.; Shankar, V. (2019). Biodiesel production using lipase immobilised functionalized magnetic nanocatalyst from oleaginous fungal lipid. *Journal of Cleaner Production*, v. 215, p. 245-258, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.12.146>.

Joshi, R.; Sharmab, R.; Kuila, A. (2019). Lipase production from *Fusarium incarnatum* KU377454 and its immobilization using Fe₃O₄ NPs for application in waste cooking oil degradation. *Bioresource Technology Reports*, v. 5, p. 134–140, <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.01.005>.

Leite, P.; Sousa, D.; Fernandes, H.; Ferreira, M.; Costa, A. R.; Filipe, D.; Gonçalves, M.; Peres, H.; Belo, I.; Salgado, J. M. (2020). Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, v. 20, p. 2452-2236, 30104-8, <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100407>.

Lopes, L. S.; Vieira, N.; Da Luz, J. M. R.; Silva, M. De C. S.; Cardoso, W. S.; Kasuya, M. C. M. (2020). Production of fungal enzymes in Macaúba coconut and enzymatic degradation of textile dye. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 26, p. 101651, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101651>.

Magalhães, A. A. da S.; Silva, T. de A.; Teixeira, M. F. S.; Filho, R. F. C.; da Silva, S. D.; Gomes, D. M. D.; Pereira, J. O. (2019). Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, v.14, n. 3, p. 453-461.

Mahesh, M.; Arivizhivendhan, K. V.; Maharaja, P.; Boopathy, R.; Hamsavathani, V.; Sekaran, G. (2016). Production, purification and immobilization of pectinase from *Aspergillus ibericus* onto functionalized nanoporous activated carbon (FNAC) and its application on treatment of pectin containing wastewater. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 133, p. 43–54, [http:// dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.07.012](http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.07.012).

Mandari, V.; Nema, A.; Devarai, S. K. (2020). Sequential optimization and large scale production of lipase using trisubstrate mixture from *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 89, p. 46-54, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.026>.

Mehta, A.; Guleria, S.; Sharma, R.; Gupta, R. (2021). The lipases and their applications with emphasis on food industry. *Microbial Biotechnology in Food and Health*, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819813-1.00006-2>.

Murugan, T.; Deepika, P.; Kowsalya, A.; Sivasubramanian, K.; Rejisha, R. P.; M. Murugan, M.; Wins, J. A. (2020). Production and characterization of extracellular pectinase from a newly isolated *Bacillus* species from fruit waste soil. *Materials Today: Proceedings*, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.09.607>.

Musatti, A.; Ficara, E.; Mapelli, C.; Sambusiti, C.; Rollini, M. (2017). Use of solid digestate for lignocellulolytic enzymes production through submerged fungal fermentation. *Journal of Environmental Management*, v. 199, p. 1-6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.022>.

Navvabi, A.; Razzaghi, M.; Fernandesb, P.; Karamid, L.; Homaeia, A. (2018). Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. *Process Biochemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.04.018>.

Oliveira, F.; Souza, C. E.; Peclat, V. R. O. L.; Salgado, J. M.; Ribeiro, B. D.; Coelho, M. A. Z.; Venâncio, A.; Belo, I. (2017). Optimization of lipase production by *Aspergillus ibericus* from oil cakes and its application in esterification reactions. *Food and Bioprocess Processing*, v. 102, p. 268-277, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.01.007>.

Papadaki, E.; Kontogiannopoulos, N. K.; Assimopoulou, A. N.; Mantzouridou, F. T. (2020). Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. *Bioresource Technology*, v. 309, 123317, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123317>.

Patel, H.; Ray, S.; Patel, A.; Patel, K.; Trivedi, U. (2020). Enhanced lipase production from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* UKHL1 and its application in oily waste-water treatment. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 28, 101731, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101731>.

Pereira, A. Da S.; Fontes-Sant'ana, G. C.; Amaral, P. F. F. (2019). Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst. *Food and Bioprocess Processing*, v. 115, p. 68-77, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.02.002>.

Phukon, L. C.; Chourasiaa, R.; Kumari, M.; Godan, T. K.; Sahoo, D.; Parameswaran, B.; Rai, A. K. (2020). Production and characterisation of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6. *Bioresource Technology*, v. 309, 123352, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123352>.

Prasanna, H. N.; Ramanjaneyulu, G.; Reddy, B. R. (2016). Optimization of cellulase production by *Penicillium* sp. *Biotech*, v. 6, 162, <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0483-x>.

Priyanka, P.; Kinsella, G. K.; Henehan, G. T.; Ryan, B. J. (2020). Isolation and characterization of a novel thermo-solvent-stable lipase from *Pseudomonas brenneri* and its application in biodiesel synthesis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 29, 101806, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101806>.

Priyanka, P.; Tan, Y.; Kinsella, G.; Henehan, G. T.; Ryan, B. J. (2018). Isolation, purification and characterization of a novel solvent stable lipase from *Pseudomonas reinekei*. *Protein Expression and Purification*, doi: 10.1016/j.pep.2018.08.007.

Quayson, E.; Amoah, J.; Hama, S.; Akihiko Kondo, A.; Ogino, C. (2020). Immobilized lipases for biodiesel production: Current and future greening opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 134, 110355, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110355>.

Radha, P.; Prabhu, K.; Jayakumar, A.; Abilashkarthik, S.; Ramani, K. (2020). Biochemical and kinetic evaluation of lipase and biosurfactant assisted ex novo synthesis of microbial oil for biodiesel production by *Yarrowia lipolytica* utilizing chicken tallow. *Process Biochemistry*, v. 95, p. 17–29, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.009>.

Rêgo, A. P. B.; Cunha, J. R. R.; Santos, R. S.; De Assis, F. G. Do V.; Leal, P. L. (2019). Produção De Enzimas CMC Case E Pectinase Por Processo Fermentativo Utilizando Casca De Café Suplementada Com Manipueira Como Substrato. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, v.8, n.1, p. 104- 121.

Rigo, E.; Ninow, J. L.; Polloni, A. E.; Remonato, D.; Arbter, F.; Vardanega, R.; De Oliveira, D.; Treichel, H.; Di Luccio, M. (2009). Improved lipase biosynthesis by a newly isolated *Penicillium* sp. grown on agricultural wastes. *Industrial Biotechnology*, v. 5, n. 2, p. 119-116,

Rodrigues, P. De. O.; Gurgel, L. V. A.; Pasquini, D.; Badotti, F.; Goes-Neto, A.; Baffi, M. A. (2020). Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. *Renewable Energy*, v. 145, p. 2683-2693, <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.041>.

Roveda, M.; Hemkemeier, M.; Colla, L. M. (2010). Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 30, n. 1, p. 126-131.

Salazar, L. N.; Dal Maso, S. S.; Ogimbosvski, T. A.; Daronch, N. A.; Zeni, J.; Valduga, E.; Backes, G. T.; Cansian, R. L. (2019). Production, Partial Characterization and Application of Cellulases by Newly Isolated *Penicillium* sp. Using Agro-Industrial Substrate Solid-State Fermentation. *Industrial Biotechnology*, v. 15, n. 2, p. 79-88, DOI: 10.1089/ind.2018.0029.

Schneider, W. D. H.; Gonçalves, T. A.; Uchimab, C. A.; Dos Reis, L.; Fontana, R. C.; Squinac, F. M.; Dillona, A. J. P.; Camassolaa, M. (2018). Comparison of the production of enzymes to cell wall hydrolysis using different carbon sources by *Penicillium*

echinulatum strains and its hydrolysis potential for lignocelulosic biomass. *Process Biochemistry*, v. 66, p. 162–170, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.11.004>.

Si, J.-B.; Jang, E.-J.; Charalampopoulos, D.; Wee, Y.-J. (2018). Purification and Characterization of Microbial Protease Produced Extracellularly from *Bacillus subtilis* FBL-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. v. 23, p. 176-182, 10.1007/s12257-017-0495-3.

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*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, v. 6, p. 87–95, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjbas.2016.11.010>.

Srivastava, N. (2019). Production of Food-Processing Enzymes from Recombinant Microorganisms. *Enzymes in Food Biotechnology*. Department of Biotechnology, CET-IILM, Greater Noida, India, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00043-8>.

Sudha, S.; Nandhini, S. U.; Mathumathi, V.; Nayaki, J. M. A. (2018). Production, Optimization and Partial Purification of Protease from Terrestrial Bacterium *Exiguobacterium profundum* sp. MM1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.002>.

Sun, S.; Zhang, Y.; Liu, K.; Chen, X.; Jiang, C.; Huang, M.; Zang, H.; Li, C. (2019). Insight into biodegradation of cellulose by psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. LKR-1 from the cold region of China: optimization of cold-active cellulase production and the associated degradation pathways. *Cellulose*, <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02798-y>.

Suriya, J.; Bharathiraja, S.; Krishnan, M.; Manivasagan, P.; Kim, S.-K. (2016). Marine Microbial Amylases: Properties and Applications. *Advances in Food and Nutrition Research*, v. 79, <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.001>.

Tacin, M. V.; Massi, F. P.; Fungaro, M. H. P.; Teixeira, M. F. S.; de Paula, A. V.; Ebinuma, V. de C. S. (2018). Biotechnological valorization of oils from agroindustrial wastes to produce lipase using *Aspergillus* sp. from Amazon *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.013>.

Taskin, M.; Ucar, M. H.; Unver, Y.; Kara, A. A.; Ozdemir, M.; Ortucu, S. (2016). Lipase production with free and immobilized cell soft-cold-adapted yeast *Rhodotorula glutinis* HL25. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 8, p. 97–103, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.08.009>.

Teixeira, A. J.; Weschenfelder, L. M.; Antunes, A.; Zeni, J.; Backes, G. T.; Cansian, R. L. (2018). Commercial and non-commercial pectinase and cellulase on the enzymatic hydrolysis efficacy of rice husk and Tifton 85 hay. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 41, 45100, 10.4025/actascianimsci.v41i1.45100.

Weiss, R.; Eischer, A.; Tadic, T.; Gritsch, S. M.; Ortner, M.; Prall, K.; Neunteufel, E.; F. Putz, R. F.; Guebitz, G. M.; Nyanhongo, G. S. (2020). Valorisation of slaughter house and deinking paper waste streams for the production of enzyme by *Trichoderma reesei*. *Journal of Cleaner Production*, v. 275, 122882, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122882>.

Werneck, G. C. (2016). Produção De Proteases Por Fungos Endofíticos Isolados De Plantas Do Cerrado. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Wu, F.; Ma, J.; Cha, Y.; Lu, D.; Li, Z.; Zhuo, M.; Luo, X.; Li, S.; Zhu, M. (2020). Using inexpensive substrate to achieve high-level lipase A secretion by *Bacillus subtilis* through signal peptide and promoter screening. *Process Biochemistry*, v. 99, p. 202–210, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.08.010>