

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MYLLENA RODRIGUES DOS SANTOS**

**ESTUDO DA PREPARAÇÃO DE UM AGREGADO ENZIMÁTICO  
RETICULADO (CLEAs) DE LIPASE PRODUZIDA POR *Aspergillus niger***

**Alfenas/MG**

**2022**

**MYLLENA RODRIGUES DOS SANTOS**

**ESTUDO DA PREPARAÇÃO DE UM AGREGADO ENZIMÁTICO  
RETICULADO (CLEAs) DE LIPASE PRODUZIDA POR *Aspergillus niger***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biomoléculas.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Joelise A F Angelotti  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Daniela B Hirata

Alfenas/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Santos, Myllena Rodrigues.

Estudo da preparação de um agregado enzimático reticulado Cleas de lipase de *Aspergillus niger* / Myllena Rodrigues Santos. - Alfenas, MG, 2022.  
114 f. : il. -

Orientador(a): Joelise de Alencar Figueira Angelotti.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.  
Bibliografia.

1. Lipases. 2. *Aspergillus niger*. 3. CLEAs. 4. Butirato de Isoamila. I. Angelotti, Joelise de Alencar Figueira, orient. II. Título.

MYLLENA RODRIGUES DOS SANTOS

**ESTUDO DA PREPARAÇÃO DE UM AGREGADO ENZIMÁTICO RETICULADO (CLEAs) DE LIPASE PRODUZIDA POR ASPERGILLUS NIGER**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 31 de maio de 2022

Profa. Dra. Joelise de Alencar Figueira Angelotti  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Marcela Pavan Bagagli  
Instituição: Instituto Federal de Avaré

Profa. Dra. Ana Karine Furtado de Carvalho  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Joelise de Alencar Figueira Angelotti, Professor do Magistério Superior**, em 02/06/2022, às 09:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARCELA PAVAN BAGAGLI, Usuário Externo**, em 02/06/2022, às 09:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ANA KARINE FURTADO DE CARVALHO, Usuário Externo**, em 02/06/2022, às 09:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0732113** e o código CRC **3B598B57**.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Wilton Rodrigues e Maria Aparecida, por todo o amor, apoio, dedicação e incentivo durante todos esses anos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por permitir a realização deste sonho, a minha família por terem sido meu porto seguro durante todos esses anos, por todo incentivo e apoio dedicado.

À Universidade Federal de Alfenas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC e ao Laboratório de Bioprocessos por oferecer a oportunidade e infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha orientadora Joelise de Alencar Figueira Angelotti, por ter depositado confiança em meu trabalho, pela orientação, aprendizado, paciência e pelos conselhos que contribuíram tanto para minha formação profissional e pessoal.

Aos professores Daniela Battaglia Hirata e Adriano Aguiar Mendes, que contribuíram com seus conhecimentos servindo de suporte para a execução deste trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Financiamento 001

## RESUMO

O mercado enzimático vem crescendo consideravelmente, este mercado foi avaliado em US\$ 6,6 bilhões em 2021, e deverá chegar a US\$ 9,1 bilhões até 2026. No setor biotecnológico as lipases vêm sendo fortemente empregadas pois são catalisadores funcionais em diversos segmentos. Sua obtenção ocorre principalmente por fontes microbianas e são responsáveis por catalisar vários tipos de reações, como hidrólise, esterificação e transesterificação, desta maneira sua aplicação se estende a várias áreas industriais. Diante desse grande potencial em expansão esse trabalho tem como objetivo apresentar através de uma revisão bibliográfica os aspectos mais relevantes da enzima, como fontes e formas de obtenção, métodos de imobilização e aplicações recentes. O propósito do estudo inclui uma seção experimental que envolve a produção, imobilização, caracterização e aplicação da lipase de modo a comparar o potencial da enzima em sua forma livre e imobilizada. Para o desenvolvimento do trabalho a metodologia envolveu a produção da enzima lipase pelo fungo *Aspergillus niger* através da fermentação semi-sólida. A lipase foi imobilizada através de uma técnica de baixo custo conhecida como CLEA (do inglês cross-linked enzyme aggregate) e caracterizada em relação a temperatura e pH de atividade e estabilidade, vida de prateleira e estabilidade operacional. Análises morfológicas foram realizadas para analisar a conformação dos agregados enzimáticos. Esses agregados foram avaliados na esterificação do álcool isoamílico e ácido butírico para obtenção do éster butirato de isoamila.

Palavras-chave: Lipases. *Aspergillus niger*. CLEAs. Butirato de Isoamila.

## ABSTRACT

The enzyme market has been growing considerably, this market was valued at US\$ 6.6 billion in 2021, and is expected to reach US\$ 9.1 billion by 2026. In the biotechnology sector, lipases have been heavily used as they are functional catalysts in several segments. They are obtained mainly from microbial sources and are responsible for catalyzing various types of reactions, such as hydrolysis, esterification and transesterification, in this way its application extends to several industrial areas. In view of this great potential in expansion, this work aims to present, through a bibliographic review, the most relevant aspects of the enzyme, such as sources and forms of obtaining, methods of immobilization and recent applications. The purpose of the study includes an experimental section that involves the production, immobilization, characterization and application of lipase in order to compare the potential of the enzyme in its free and immobilized form. For the development of the work, the methodology involved the production of the enzyme lipase by the fungus *Aspergillus niger* through semi-solid fermentation. Lipase was immobilized using a low-cost technique known as CLEA (cross-linked enzyme aggregate) and characterized in relation to temperature and pH, activity and stability, shelf life and operational stability. Morphological analyzes were performed to analyze the conformation of the enzymatic aggregates. These aggregates were evaluated in the esterification of isoamyl alcohol and butyric acid to obtain the isoamyl butyrate ester.

Keywords: Lipases. *Aspergillus niger*. CLEAs. Isoamyl butyrate.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reações catalisadas por lipase .....	18
Figura 2 - Segmentos e industriais com águas residuais ricas em matérias orgânicas de onde podem ser isolados microrganismos produtores de lipases .....	33
Figura 3 - Métodos de imobilização de enzimas: adsorção, confinamento, ligação covalente e reticulação .....	34
Figura 4 - Aplicabilidades da lipase nos setores industriais .....	38
Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura da enzima livre e precipitada .....	87
Figura 6 - Esquematização da esterificação do ácido/álcool para conversão do éster .....	100

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Cinética da fermentação do fungo <i>A.niger</i> em meio contendo farelo de trigo, solução de salina e azeite de oliva como indutor .....	79
Gráfico 2 - Atividade residual (%) da lipase frente a diversos agentes precipitantes .....	81
Gráfico 3 - Concentração de proteínas (%) frente a diversos agentes precipitantes .....	83
Gráfico 4 - Validação das condições do ensaio 6 para produção dos Cleas (25mM de glutaraldeído e 9,37 mg de proteína).....	86
Gráfico 5 - Curvas TGA do derivado (Cleas) e da enzima livre .....	88
Gráfico 6 - Atividade relativa (%) da lipase livre e imobilizada em diferentes faixas de temperatura.....	89
Gráfico 7 - Atividade relativa (%) da lipase livre e imobilizada em diferentes faixas de pH .....	90
Gráfico 8 - Temperatura de estabilidade da lipase livre e imobilizada em diferentes faixas de temperatura .....	92
Gráfico 9 - pH de estabilidade da lipase imobilizada (A) e livre (B) em diferentes faixas de pH. ....	93
Gráfico 10 - Perfis de inativação térmica .....	96
Gráfico 11 - Atividade relativa (%) da lipase livre e imobilizada de acordo o tempo de armazenamento.....	97
Gráfico 12 - Estabilidade da lipase imobilizada em meio contendo heptano.....	98
Gráfico 13 - Síntese de butirato de isoamila em sistema com solvente heptano.....	100
Gráfico 14 - Estabilidade operacional dos CLEAs na síntese de éster butirato de isoamila..	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fontes vegetais para obtenção de lipases .....	22
Tabela 2 - Fontes animais para obtenção de lipases .....	22
Tabela 3 - Fontes microbianas para obtenção de lipases .....	23
Tabela 4 - Produção da atividade lipásica de <i>Aspergillus niger</i> frente a diversos substratos .....	25
Tabela 5 - Características bioquímicas de algumas lipases microbianas.....	26
Tabela 6 - Métodos de imobilização enzimática e diferentes tipos de suporte.....	36
Tabela 7 - Variáveis e níveis estudados .....	75
Tabela 8 - Matriz do planejamento fatorial utilizado .....	75
Tabela 9 - Atividade da lipase em diferentes concentrações de BSA e Glutaraldeído .....	84
Tabela 10 - Dados cinéticos de inativação térmica de lipase e imobilizada em diferentes valores de temperatura. ....	94
Tabela 11 - Dados cinéticos de inativação térmica de lipase imobilizada a 40 °C em meio de heptano. ....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLEAs	Cross-linked enzyme aggregates
pH	Potencial hidrogeniônico
CAGR	Compound Annual Growth Rate
p-NPP	para-nitrofenilfosfato
FS	Fermentação submersa
FES	Fermentação em estado sólido
FDA	US Food and Drug Administration
GRAS	Geralmente reconhecidas como seguras
YEP	Meio líquido sintético
BSA	Albumina de soro bovino
TPP	Tripolifosfato de sódio
FFA	Ácidos graxos livre
TGs	Triglicerídeos
p-NPA	p-nitrofenil acetato
ABD	Ágar batata dextrose
<i>K<sub>d</sub></i>	Constante de inativação térmica
FE	Eficiência de imobilização
RPM	Rotação por minuto
NaOH	Hidróxido de sódio
DEGME	Éter monometílico de dietilenoglicol
DME	1,2-dimetoxietano
GA	Gluutaraldeído
TGA	Análise Termogravimétrica
p-CLEAs	CLEAs porosos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO LITERATURA / DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>16</b>
2.1	LIPASES: FONTES DE OBTENÇÃO, FORMAS DE PRODUÇÃO E APLICAÇÕES RECENTES	16
<b>2.1.1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Revisão bibliográfica .....</b>	<b>19</b>
2.1.2.1	Fontes Tradicionais .....	19
2.1.2.1.1	Lipases vegetais .....	19
2.1.2.1.2	Lipases de origem animal .....	20
2.1.2.1.3	Lipases microbianas .....	21
2.1.2.2	Lipases de <i>Aspergillus niger</i> .....	24
2.1.2.3	Características bioquímicas .....	25
2.1.2.4	Produção de lipases: tipo de fermentação e nutrientes .....	28
2.1.2.5	Lipases produzidas por microrganismos isolados de resíduos industriais .....	31
2.1.2.6	Imobilização de enzimas .....	34
2.1.2.7	Aplicações industriais .....	37
2.1.2.7.1	Lipases na indústria alimentícia .....	38
2.1.2.7.2	Lipases na produção de biodiesel .....	39
2.1.2.7.3	Lipases na indústria farmacêutica .....	41
2.1.2.7.4	Lipases na indústria de detergentes .....	41
2.1.2.7.5	Lipases no tratamento de efluentes.....	42
2.1.2.7.6	Lipases em cosméticos .....	43
2.1.2.7.7	Lipases na produção de biossensores .....	44
2.1.2.7.8	Lipase na indústria têxtil .....	45
2.1.2.7.9	Lipases na biorremediação .....	45
<b>2.1.3</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>46</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Referências .....</b>	<b>47</b>
2.2	PREPARAÇÃO, CARACTERIAZAÇÃO E APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE UM	

	AGREGADO ENZIMÁTICO RETICULADO DE LIPASE PRODUZIDA POR <i>ASPERGILLUS NIGER</i> .....	68
<b>2.2.1</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>69</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Metodologia</b> .....	<b>71</b>
2.2.2.1	Ativação do microrganismo e preparo do inóculo .....	71
2.2.2.2	Produção e extração da enzima .....	72
2.2.2.3	Determinação da atividade enzimática .....	72
2.2.2.4	Determinação do teor de proteínas totais .....	73
2.2.2.5	Preparação dos CLEAs .....	73
2.2.2.5.1	Seleção do agente precipitante .....	73
2.2.2.5.2	Protocolo de preparação dos CLEAs .....	74
2.2.2.6	Otimização dos parâmetros de preparação dos CLEAs utilizando metodologia de planejamento experimental .....	74
2.2.2.7	Caracterização Morfológica.....	75
2.2.2.7.1	Microscopia eletrônica de varredura .....	75
2.2.2.7.2	Análise Termogravimétrica .....	76
2.2.2.8	Caracterização bioquímica .....	76
2.2.2.8.1	Determinação da temperatura ótima de atividade .....	76
2.2.2.8.2	Determinação do pH ótimo de atividade .....	76
2.2.2.8.3	Determinação do pH e temperatura de estabilidade .....	76
2.2.2.8.4	Parâmetros termodinâmicos .....	77
2.2.2.8.5	Estabilidade de armazenamento .....	77
2.2.2.9	Síntese de éster butirato de isoamila.....	77
2.2.2.9.1	Estabilidade em solvente orgânico .....	77
2.2.2.9.2	Condições das reações de esterificação .....	78
2.2.2.9.3	Determinação da porcentagem de esterificação .....	78
2.2.2.10	Estabilidade operacional do biocatalisador.....	78
<b>2.2.3</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>79</b>
2.2.3.1	Produção da lipase pelo <i>Aspergillus niger</i> .....	79
2.2.3.2	Seleção do agente precipitante e quantificação de proteínas.....	80
2.2.3.3	Otimização dos parâmetros de preparação dos CLEAs utilizando metodologia de planejamento experimental.....	83
2.2.3.4	Caracterização Morfológica.....	87
2.2.3.4.1	Microscopia eletrônica de varredura .....	87

2.2.3.4.2	Análise Termogravimétrica .....	88
2.2.3.5	Caracterização bioquímica .....	89
2.2.3.5.1	Determinação da temperatura e pH ótimo de atividade .....	89
2.2.3.5.2	Determinação da temperatura e pH de estabilidade .....	91
2.2.3.5.3	Parâmetros termodinâmicos .....	94
2.2.3.5.4	Estabilidade de armazenamento .....	96
2.2.3.6	Síntese de éster butirato de isoamila .....	97
2.2.3.6.1	Estabilidade em solvente orgânico .....	97
2.2.3.6.2	Esterificação .....	99
2.2.3.6.3	Eficiência da reutilização.....	101
<b>2.2.4</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>102</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Referências .....</b>	<b>103</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>111</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>112</b>



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção enzimática utilizando microrganismos vem crescendo consideravelmente, isso se deve a capacidade que essas biomoléculas possuem em participar de diferentes reações voltadas a aplicações industriais como nos setores alimentício, químico e farmacêutico (RIGO *et al.*, 2021). O mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 6,6 bilhões em 2021, e deverá chegar a US\$ 9,1 bilhões até 2026, registrando um CAGR (Compound Annual Growth Rate) de 6,6% durante o período de previsão (MARKETS AND MARKETS, 2022). As lipases têm ampla participação nesse número, pois são catalisadores funcionais em diversos segmentos, sendo o terceiro maior grupo de enzimas comerciais (PHUKON *et al.*, 2020). As lipases são enzimas com potencial hidrolítico mas sua atividade catalisadora se estende a outras reações como esterificação, interesterificação (acidólise, e transesterificação e aminólise) (FACIN *et al.* 2019).

As lipases microbianas são obtidas principalmente por vias extracelulares, no processo de obtenção a formulação do meio de cultivo interfere diretamente na produção da enzima, uma opção que vem sendo explorada é a utilização de resíduos agroindustriais como substrato para a produção lipásica, simultaneamente essa prática soluciona o problema de descarte desses resíduos (BOSE; KEHARIA, 2013). Um levantamento feito por Guedes *et al.*, (2021) identificou que a produção de lipases extracelular ocorre especialmente com fungos sendo que o gênero mais estudado é o *Aspergillus sp.* seu estudo revelou que a utilização de resíduos agroindustriais é uma alternativa favorável para a produção de lipase, e a associação de suplementos ao meio resulta em melhores produtividades, essa junção permite intensificar a produção além de tornar o processo de produção mais viável economicamente.

Inúmeras são as aplicações da lipase, são enzimas classificadas como sustentáveis, fato este atrelado a capacidade da lipase em biodegradar resíduos lipídicos servindo de rota alternativa para processos tradicionais de degradação. São biomoléculas que proporcionam a produção de produtos de alto valor agregado, na indústria farmacêutica e medicinal as lipases desempenham papel importante agindo como moduladores, ativadores e inibidores em tratamentos a determinadas doenças (CHANDRA *et al.*, 2020). Como são moléculas versáteis, a demanda pela enzima é crescente, concomitantemente a isso houve uma preocupação em aprimorar as propriedades desse biocatalisador bem como otimizar e criar novas metodologias economicamente viáveis para fomentar a sua produção (MEHTA *et al.*, 2021).

Vários são os benefícios associadas ao uso da lipase, no entanto algumas desvantagens são condicionadas ao uso da enzima livre, como baixa estabilidade em condições industriais

drásticas e dificuldade em recuperar a molécula do meio reacional para posterior uso. Para contornar essas adversidades as técnicas de imobilização são implementadas na intenção de tornar a aplicação de enzimas mais atrativa do ponto de vista industrial (FENG *et al.*, 2021). As metodologias voltadas para a imobilização enzimática incluem adsorção, ligação covalente, encapsulamento e ligação cruzada (NGUYEN; KIM, 2017). A prática da imobilização permite alcançar biocatalisadores com características catalíticas e operacionais mais aprimoradas, requeridas pela indústria (SOUZA *et al.*, 2017).

Em síntese o uso das lipases contribuem para redução da catálise química, dando oportunidade a biocatálise que agrega na criação dos produtos “verdes” caracterizados por maior grau de pureza, além de diminuir a carga química lançada ao meio ambiente (GAMAYUROVA *et al.*, 2020).

Diante do exposto o objetivo desse trabalho é fazer uma revisão sobre os principais aspectos e atualidades relacionados a lipase e desenvolver um trabalho experimental com foco na produção da enzima lipase utilizando o microrganismo *Aspergillus niger* por fermentação semissólida, imobilizar, caracterizar e avaliar o potencial da lipase em uma reação de esterificação para obtenção do éster butirato de isoamila.

## 2 REVISÃO LITERATURA / DESENVOLVIMENTO

### 2.1 LIPASES: FONTES DE OBTENÇÃO, FORMAS DE PRODUÇÃO E APLICAÇÕES RECENTES

**Santos, M. R<sup>1</sup>.; Hirata, D. B<sup>2</sup>.; Angelotti, J. A. F<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup> Mestranda em Biotecnologia, Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Centro – Alfenas – MG, CEP 37130-001 myllena.rodrigues@sou.unifal-mg.edu.br

<sup>2</sup> Professora Dra. em Engenharia Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Centro – Alfenas – MG, CEP 37130-001 daniela.hirata@unifal-mg.edu.br

<sup>3</sup> Professora Dra. em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Centro – Alfenas – MG, CEP 37130-001 joelise.angelotti@unifal-mg.edu.br

#### **Resumo**

Enzimas têm sido amplamente aplicadas em processos biotecnológicos em diversas áreas da indústria, além de serem reconhecidas como sustentáveis e seguras, a especificidade é outra característica que melhora o desempenho no processo. Dentre as enzimas, as lipases são relevantes devido sua capacidade em desempenhar diferentes papéis na indústria e a possibilidade de obtenção através de fontes microbianas que pode ser encontradas em resíduos industriais sendo uma alternativa de redução de custos de produção de enzimas. Aliado a isso a imobilização da lipase é uma tecnologia interessante que permite que a enzima seja reutilizada podendo dessa forma melhorar a robustez da enzima, entre as técnicas de imobilização a metodologia CLEAs está ganhando atenção devido à simplicidade, baixo custo devido à ausência de suporte, maior interação com substrato. Assim, o objetivo deste artigo de revisão foi mostrar o potencial da lipase apresentando as tradicionais e novas fontes de obtenção, além de formas de melhorar a produção, atividade e suas inúmeras aplicação na indústria.

### 2.1.1 Introdução

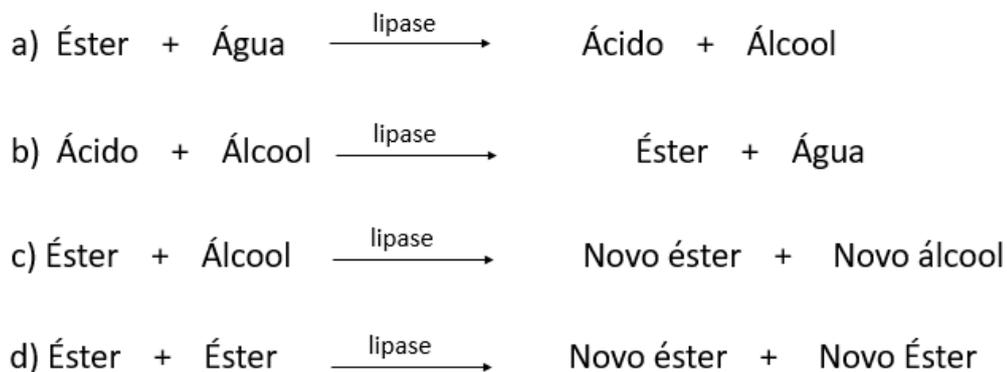
As enzimas são proteínas globulares que participam de reações químicas tornando esse processo mais rápido. Elas atuam reduzindo a energia de ativação que é essencial para que a reação ocorra, dessa maneira as enzimas têm sido aplicadas cada vez mais em procedimentos biotecnológicos, uma vez que essas moléculas apresentam características importantes como especificidade, biodegradabilidade e têm a capacidade de operar em ambientes facilmente controláveis (MALAJOVICH, 2016; RESENDE; SOCCOL; FRANÇA, 2016).

No setor industrial as enzimas vêm sendo amplamente utilizadas, além de serem caracterizadas como uma metodologia sustentável e segura, sua aplicação garante um melhor desempenho, fornecendo produtos com maior funcionalidade e com maiores rendimentos (GUERRAND, 2017). As enzimas são utilizadas em diversas áreas devido a sua ampla aplicabilidade e particularidade (LIU; KOKARE, 2017). O mercado global de enzimas vem se expandindo fortemente, em 2019 ele foi estimado em US\$ 9,9 bilhões de dólares com uma taxa composta de crescimento anual de 7,1% de 2020 a 2027 (Enzymes Market Size, 2021).

As hidrolases são uma classe de enzima largamente aplicadas na área industrial, sendo as amilases, proteases e lipases as enzimas mais empregadas (HOMAEI, 2015). Dentre as enzimas que ganharam destaque no mercado industrial, destacam-se as lipases microbianas, por possuírem um grande potencial biotecnológico e inúmeras aplicabilidades, atraindo dessa maneira maior interesse comercial (SHARMA; SHARMA; SAXENA, 2016).

As lipases são proteínas que atuam em sistemas aquosos e não aquosos, nas quais ocorre o fenômeno conhecido como ativação interfacial. Na presença de água as lipases atuam catalisando as reações de hidrólise de triglicerídeos, gerando moléculas de glicerol e ácidos graxos, contudo, em meios nos quais há uma baixa atividade de água, as lipases realizam reações reversa, tais como esterificação, e transesterificação (GAO *et al*, 2018; AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015). As principais reações catalisadas pelas lipases podem ser observadas na figura abaixo:

Figura 1 - Reações catalisadas por lipase



Legenda: a) hidrólise, b) esterificação, c) transesterificação e d) interesterificação.

Fontes das figuras: Elaborada pelo autor (2021).

Nas transformações metabólicas as lipases são grandemente empregadas em função das suas particularidades como especificidade, disponibilidade, não requerimento do uso de cofatores e habilidade de operar em grandes concentrações de substrato (KAZLAUSKAS, 2016), além de poderem apresentar regiosseletividade e enantiosseletividade (CASAS-GODOY *et al.*, 2018). As lipases trabalham na forma aberta e fechada, esse mecanismo da enzima é controlado por uma espécie de tampa que oculta o sítio catalítico da enzima. Uma condição de microhidratação é necessária ao sítio ativo da enzima para que ela possa realizar o deslocamento da tampa e expor assim o seu sítio ativo da que possa ocorrer a catálise (KHAN *et al.*, 2017). No entanto algumas enzimas, como a lipase B da *Candida antártica* o bloqueio do sítio catalítico é apenas parcial, pois sua tampa tem tamanho reduzido (MONTEIRO *et al.*, 2021). As lipases B da *C. antártica* assumem uma maior abertura em condições aquosas quando comparadas a outras lipases (LUAN; ZHOU, 2017).

As lipases ainda podem ser reaproveitadas, o que possibilita uma redução no alto custo envolvido, para isso é preciso recuperar as enzimas empregadas no processo para que então possam ser utilizadas novamente. Entretanto, essa recuperação trata-se de um processo muito complexo quando as mesmas estão na sua forma solúvel, uma alternativa a isso seria a aplicação das enzimas na forma imobilizada (LIU *et al.* 2017). Essa revisão tem o intuito de apresentar as fontes tradicionais e alternativas de obtenção das lipases, métodos de imobilização e suas aplicações mais recentes na indústria farmacêutica, alimentícia, dentre outras áreas.

## 2.1.2 Revisão bibliográfica

### 2.1.2.1 Fontes Tradicionais

As lipases podem ser encontradas em diversas fontes, podendo ser produzidas por animais, plantas e microrganismos, esse último engloba bactérias, fungos e leveduras. Com o aumento da utilização dessa enzima, há uma grande necessidade de se descobrir novas fontes para suprir as necessidades industriais (BANCERZ, 2017). Há um maior interesse pelas lipases de origem microbiana, e isso se deve a uma série de fatores que incluem resistência a altas temperaturas e por apresentarem maior produtividade com relação as demais fontes (GEOFFRY; ACHUR, 2018a).

#### 2.1.2.1.1 Lipases vegetais

As lipases vegetais podem ser encontradas em diversos tipos de plantas, estando presente em sementes, grãos, nas frutas e folhas, contudo a maioria das lipases é extraída das sementes, principalmente por apresentar um potencial de hidrólise mais significativo quando comparado com as demais partes. Essas fontes de lipases denotam baixo custo de produção e são altamente estáveis nos processos de interesterificação (SARMAH *et al.* 2017).

As enzimas encontradas em plantas possuem vantagens com relação às enzimas microbianas, sua obtenção requer uma metodologia mais simples e não exige a utilização de técnicas de engenharia genética. Esses fatores levam a um menor gasto, fazendo com que essas enzimas possam chegar a custar 20 vezes menos com relação às enzimas obtidas pelas fermentações (MOUNGUENGUI *et al.* 2013). Por serem enzimas de origem vegetal há uma grande aceitação da sua aplicação na área alimentícia e farmacêutica, no entanto algumas desvantagens são associadas a utilização dessas lipases, como a baixa disponibilidade dos vegetais com atividade lipásica na natureza, sazonalidade, a diminuição da capacidade lipásica frente as técnicas de purificação aplicadas (SETH *et al.*, 2014 apud SARMAH *et al.* 2017).

Tavares *et al.* 2018, estudaram a produção de lipases obtidas por sementes de mamona e avaliou o seu potencial hidrolítico no óleo de cambre, o autor observou que as sementes em sua forma in natura mostrou propriedades emulsificantes o que confere uma maior vantagem para as reações hidrolíticas. Kouteu *et al.* 2016 investigaram a atividade da lipase em extratos brutos de sementes de *Adansonia suarezensis*, *Adansonia grandidieri*, *Moringa drouhardii*, *Moringa oleifera*, *Jatropha mahafalensis* e *Jatropha curcas*, foram visto que todos os extratos

demonstraram atividades de etanolise e hidrólise.

A presença da lipase também foi identificada em resíduos de laranja por Okino-Delgado; Fleuri (2014), essas enzimas revelaram boas características bioquímicas como atuação em pH amplo entre 6-9, temperatura ótima em torno de 20°C a 60°C, implicando uma termoestabilidade alta, sendo a atividade da lipase mensurada em 68,5 lipase U/g. Moreau *et al.* 2016, utilizaram os grãos de sorgo como matéria prima para extrair lipases. A atividade lipásica foi estimada através da liberação de ácidos graxos, e inicialmente no os níveis de ácidos graxos livres foram  $3,76 \pm 0,38\%$ , e nas amostras armazenadas por 7 e 14 dias a 4 ° C, os níveis eram  $4,63 \pm 0,08$  e  $5,12 \pm 1,08\%$ , indicando que os grãos de sorgo possuem enzimas lipásicas.

#### 2.1.2.1.2 Lipases de origem animal

Os animais são outra fonte de lipases, sendo que no início as principais fontes dessas enzimas eram o pâncreas de suínos e humanos, no entanto, atualmente sua obtenção para fins comerciais incluem os microrganismos como principal fonte (BORELLI; TRONO, 2015), além de outros animais como carneiro, bezerro e cordeiro (GUERRAND, 2017). Para viabilizar o uso de lipases suínas, para aplicação industrial, essas enzimas passam por processos recombinantes, o que permite ainda maiores proporções de rendimento. Entretanto sua aplicação em processos industriais não é algo usual, isso decorre em virtude da dificuldade nas etapas de extração e purificação até o produto final (BORELLI; TRONO, 2015). Outra característica que impede o emprego das lipases pancreáticas obtidas de animais é que, na maioria das vezes, essas enzimas não estão na sua forma pura, algumas lipases suínas contam com a presença de determinados aminoácidos que atribuem um sabor amargo limitando a aplicação na indústria alimentícia (SHARMA; KANWAR, 2014).

A aplicação das lipases provenientes de animais está mais limitada aos procedimentos que envolvem o diagnóstico clínico (SARMAH *et al.* 2017). Apesar da baixa utilização dessas enzimas nos processos biotecnológicos, ainda é observado o emprego de lipases suínas em algumas atividades, como por exemplo no tratamento de efluentes de curtume (LIMA; PRATES; FAZOLO, 2020) e no tratamento de águas residuais de indústrias lácteas (MENDES *et al.*, 2010).

Lipases do fígado de robalo foram extraídas e posteriormente o extrato bruto de lipase foi preparado na intenção de utilizá-lo no desengorduramento da pele de peixe, sendo que a atividade da lipase-foi descrita em 7,24 U/g de tecido. A enzima exibiu a maior atividade hidrolítica para p-NPP a 50 ° C e pH 8,0 (SAE-LEAW; BENJAKUL, 2018).

### 2.1.2.1.3 Lipases microbianas

As lipases podem ser produzidas por microrganismos e há um interesse particular das indústrias nessa fonte enzimática, sendo amplamente empregadas na área biotecnológica (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019). As lipases microbianas são preferíveis devido a uma série de características que as tornam mais atrativas quando comparado as lipases vegetais e animais. Além da facilidade em modificar geneticamente os microrganismos, essa fonte proporciona altos rendimentos enzimáticos, possibilitando ainda lipases altamente estáveis (GUPTA *et al.*, 2015). Sua capacidade de tolerância a solventes orgânicos é um dos fatores que as tornam mais requeridas pelos processos biotecnológicos (THAPA *et al.*, 2019; SALIHU; ALAM, 2015). As lipases microbianas têm atuação em uma ampla faixa de pH e temperatura, e ainda podem possuir regio, quimio e enantiosseletividade (WANG *et al.*, 2015).

Estima-se que as reações catalisadas por lipases representaram aproximadamente 20% das biotransformações realizadas em 2019, o que demonstra a versatilidade dessa classe de enzimas por ser capaz de catalisar tanto reações de hidrólise quanto de síntese (HILLS, 2003; HASAN; SHAN; HAMEED, 2006; DONG *ET AL.*, 2012; CHANDRA *ET AL.*, 2020).

Dentre os microrganismos produtores de lipases encontram-se os fungos, bactérias e leveduras (MAHALE *ET AL.*, 2015). As lipases de origem bacterianas são caracterizadas por serem resistentes às condições empregadas no cenário industrial e dispõe de uma grande capacidade em participar de inúmeras aplicações, podendo apresentar-se de maneira intracelular, extracelular ou presas à membrana (JAVED *et al.*, 2018). Dentro da indústria alimentícia as lipases de origem bacteriana são menos empregadas quando comparadas às lipases fúngicas, isso se deve ao fato de algumas características associadas a elas como menor especificidade ao substrato e por não suportarem altas temperaturas como as lipases fúngicas. Por outro lado a obtenção de lipases por bactérias permite atingir melhores rendimentos (FATIMA *et al.*, 2014). Para obtenção de lipases bacterianas o método mais empregado é a fermentação submersa (FS) (COLLA *et al.*, 2016). Esse tipo de fermentação é requerida principalmente quando a intenção é a produção em ampla escala, pois permite o acompanhamento dos parâmetros físico-químicos que são necessários para o desenvolvimento dos microrganismos envolvidos (PATNALA *et al.*, 2016).

Dentre os diversos grupos de microrganismos produtores de lipases, os fungos são os mais atraentes para a área industrial, uma vez que essas fontes frequentemente são extracelulares, permitindo uma extração mais simples. (FERRAZ, SOUZA, SILVA; 2018 Apud

RODRIGUES *et al.*, 2016). Lipases fúngicas apresentam particularidades requeridas pelo setor biotecnológico como estabilidade, especificidade e facilidade em produção (SARMAH *et al.*, 2017). A produção de lipases por fungos ocorre principalmente através de processos fermentativos em estado sólido (FES), o que oferece vantagem ao processo, uma vez que se trata de um método mais econômico (COLLA *et al.*, 2015).

Uma infinidade de microrganismos são descritos como bons produtores de lipase, entre eles estão os fungos, especialmente dos gêneros de *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor* e *Rhizomucor*; leveduras dos gêneros *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Saccharomycopsis*, e bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Staphylococcus* (LIU, KOKARE, 2017). Nas tabelas 1, 2 e 3 podemos encontrar as lipases obtidas através das fontes abordadas no item 2.2.1.

Tabela 1 - Fontes vegetais para obtenção de lipases

<b>Espécie</b>	<b>Referência</b>
<i>Ricinus communis L</i>	SILVA; KOOP; GIORDANO, 2015; AVELAR <i>et al.</i> 2013; TAVARES <i>et al.</i> , 2018.
<i>Citrus sinensis</i>	OKINO-DELGADO; FLEURI, 2014
<i>Oryza sativa</i>	CHEN <i>et al.</i> , 2019
<i>Cucurbita moschata</i>	AMID <i>et al.</i> , 2015.
<i>Prunus dulcis</i>	HUANG <i>et al.</i> 2017.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Tabela 2 - Fontes animais para obtenção de lipases

<b>Espécie</b>	<b>Referência</b>
<i>Sus scrofa domesticus</i>	BORELLI; TRONO, 2015; LIMA; PRATES; FAZOLO, 2020; MENDES <i>et al.</i> , 2010; BAVANDI; HABIBI; YOUSEFI, 2020.
<i>Hexaplex trunculus</i>	ZARAI <i>et al.</i> , 2012.
<i>Gryllus bimaculatus</i>	WEIDLICH; HOFFMANN; WOODRING, 2015.
<i>Thunnus orientalis</i> , <i>Totoaba macdonaldi</i> , <i>Morone saxatilis</i>	RUEDA-LÓPEZ; MARTÍNEZ-MONTAÑO; VIANA, 2016.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Tabela 3 - Fontes microbianas para obtenção de lipases

Espécie	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	LIMA <i>et al.</i> , 2019a; CUJILEMA-QUITIO <i>et al.</i> , 2018.
<i>Serratia marcescens</i>	PADILLA; TABAREZ; ORDUZ, 2017.
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	AGUIAR <i>et al.</i> , 2018.
<i>Bacillus subtilis</i>	AGUIAR <i>et al.</i> , 2018.
<i>Pleurotus ostreatus</i>	PISCITELLI <i>et al.</i> , 2017.
<i>Rhizomucor sp</i>	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2016.
<i>Penicillium sp</i>	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2016.
<i>Aspergillus flavo-furcatis</i>	ROMANO <i>et al.</i> , 2020.
<i>Aspergillus terreus</i>	SETHI; NANDA; SAHOO, 2016; SIDENEY <i>et al.</i> , 2017.
<i>Cunninghamella echinulata</i>	SALES <i>et al.</i> , 2017.
<i>Geotrichum spp</i>	MALDONADO, 2017.
<i>Yarrowia lipolytica</i>	LOUHASAKUL; CHEIRSILP; PRASERTSAN, 2016; SOARES <i>et al.</i> , 2015; CARVALHO <i>et al.</i> , 2017.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BADGUJAR; BHANAGE, 2016.
<i>Burkholderia cepacia</i>	MARTIN <i>et al.</i> , 2018; FAN <i>et al.</i> , 2017.
<i>Staphylococcus warneri</i>	YELE; DESAI, 2015.
<i>Bacillus stratosphericus</i>	GRICAJEVA <i>et al.</i> , 2016.
<i>Candida rugosa</i>	ZARE <i>et al.</i> , 2018; BARRIUSO <i>et al.</i> , 2016.
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	ZARINVIARSAGH; EBRAHIMIPOUR; SADEGHI, 2017.
<i>Halomonas sp</i>	GUTIÉRREZ-ARNILLAS <i>et al.</i> , 2016.
<i>Aureobasidium pullulans</i>	LI <i>et al.</i> , 2019.
<i>Pseudomonas sp</i>	RIOS <i>et al.</i> , 2018; HAQ <i>et al.</i> , 2020.
<i>Rhizopus microsporus</i>	MARTÍNEZ-RUIZ <i>et al.</i> , 2018.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KHAN <i>et al.</i> , 2020.

<i>Pseudomonas cepacia</i>	CAO <i>et al.</i> , 2016.
<i>Arthrographis curvata</i>	AAMRI <i>et al.</i> , 2020.
<i>Rhodospiridium babjevae</i>	AAMRI <i>et al.</i> , 2020.
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	MARTINEZ-CORONA <i>et al.</i> , 2020.

---

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

### 2.1.2.2 Lipases de *Aspergillus niger*

A espécie fúngica *A. niger* tem sido alvo da biotecnologia pela sua capacidade de produção enzimática em altas concentrações bem como sua habilidade em produzir suprimentos farmacêuticos benéficos para a saúde humana e animal (CAIRNS; NAI; MEYER, 2018). O *A. niger* tem se mostrado um bom produtor de enzimas extracelulares, como amilases, celulase e lipases (BELLAOUCHI *et al.*, 2021). Um fator positivo a respeito da lipases de *A. niger* é o seu reconhecimento pela FDA (US Food and Drug Administration) como substâncias GRAS (geralmente reconhecidas como seguras) a serem utilizadas em formulações de produtos que entrarão em contato direto com o corpo humano (U.S. Food and Drug Administration, 2018).

Na literatura há diversos relatos da utilização do *A. niger* como bom produtor de lipases. Suyanto, Soetarto e Cahyanto (2019) obtiveram alta atividade lipásica (10,83 U.mL<sup>-1</sup>) com o *A. niger* através da fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais como substrato. A fermentação em estado submerso também pode ser aplicada na produção de lipases pelo *A. niger*; como reportado por Lima *et al.* (2019a), que avaliaram o efeito das variáveis no processo de produção de lipases por *A. niger* C por fermentação submersa, a cinética de produção da lipase desse estudo evidenciou que é possível alcançar notáveis rendimentos em um breve período de fermentação, o que é um ponto positivo nos processos industriais, já que a economia de tempo e energia são fatores importantes em uma produção de larga escala.

Uma das principais aplicações das lipases de *A. niger* tem sido na produção de biodiesel (GULDHE *et al.*, 2016), a enzima imobilizada foi utilizada em quatro ciclos na síntese desse biocombustível por Aliyah *et al.* (2016). Outras aplicações incluem o seu uso no tratamento de efluentes industriais (ZULKIFLI; RASIT, 2020; GOLUNSKI *et al.*, 2017) Essas lipases tem potencial aplicação na indústria alimentar, uma vez que tem sido empregadas na síntese de ésteres de sabores (CONG *et al.*, 2019a; CONG *et al.*, 2019b)

Vários são os estudos publicados referente a produção da lipase por espécies de *A. niger*. A atividade da lipase produzida por esse fungo irá depender do substrato empregado, como

mostra na tabela 4 a seguir.

Tabela 4 - Produção da atividade lipásica de *Aspergillus niger* frente a diversos substratos.

Substrato	Atividade Lipase	Referência
Farelo de arroz	176 U/ml	PUTRI <i>et al.</i> , 2020
Farelo de arroz e glicerol	19,844 U/g	COSTA <i>et al.</i> , 2017
Farelo de soja	163,33 U/g DSS	PRABANINGTYAS <i>et al.</i> , 2018
Azeite	5,12 ± 0,059 U/ml	MUKHTAR <i>et al.</i> , 2015
Casca de arroz, bolo de semente de algodão e casca de grama vermelha	28,19 U/gds	NEMA <i>et al.</i> , 2019
Farelo de soja com casca de soja	25 U/g	REINEHR <i>et al.</i> , 2016
Farelo de arroz, torta de dendê, torta de amendoim e amido	76,7 U/ml	ADIO <i>et al.</i> , 2015
Sementes de mangaba	62,5 U/g	SANTOS <i>et al.</i> , 2017

DSS: gramas de substrato

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

### 2.1.2.3 Características bioquímicas

As propriedades bioquímicas das lipases variam de acordo as fontes, microbianas, animal ou vegetal (ZHOU *et al.*, 2017). Diante de uma grande variedade de microrganismos com capacidade lipásica, as lipases produzidas pelas diferentes cepas apresentam características distintas de operação. Alguns fatores têm a capacidade de impossibilitar ou estimular a produção dessa enzima, a presença de determinados compostos como glicose, frutose e glicerol faz com que a produção da lipases seja inibida, contudo sua produção é fomentada em situações onde há a concentrações de ácidos graxos livres, triglicerídeos ou glicanos complexos (REIS *et*

*al.*, 2015).

O cultivo microbiano para a produção enzimática é afetado por diversos fatores. O potencial hidrogeniônico (pH) do processo de fermentação é um dos fatores extremamente importante (LALL *et al.*, 2014). Alguns parâmetros como temperatura, composição do meio, volume de inoculação, aeração e agitação podem interferir no processo de produção e obtenção enzimática (KISHAN *et al.*, 2013). Outras condições que afetam a produção de lipases são os nutrientes empregados, como as fontes de carbono e nitrogênio (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019). Em geral as lipases atuam em uma faixa de pH entre 6,0 e 8,0 e temperatura entre 30-40°C, todavia esses valores podem sofrer alterações conforme a fonte enzimática (PASCOAL *et al.*, 2018).

Apesar de haver um consenso de que essas enzimas possam atuar em uma faixa de pH ótimo de 4-9 e temperatura entre 25-70 °C (ZHOU *et al.*, 2017), alguns estudos mostram atividade enzimática em pH extremamente ácido de 2.0 (SANTOS *et al.*, 2017), e em pH de caráter básico de 11.0 (SANTOS *et al.*, 2014). Outros estudos demonstram a capacidade das lipases agirem em altas faixas de temperatura, como é evidenciado por Liu, Li e Yan, (2017) que caracterizaram a lipase de *Pseudomonas fluorescens*, onde foi observado que a lipase atuou em uma temperatura ótima de 70°C e que a mesma permaneceu ativa em temperaturas entre 80 - 100°C. Colla *et al.*, 2015, em sua pesquisa realizaram a caracterização das lipases de *Aspergillus flavus* e *A. niger* por fermentação submersa e em estado sólido, respectivamente. As lipases produzidas pela fermentação submersa tiveram 80% de estabilidade em pH ácido, enquanto que as lipases obtidas pela fermentação em estado sólido mostraram estabilidade superior a 60% em pH alcalino. A tabela 5 exemplifica as características bioquímicas de algumas lipases microbianas.

Tabela 5 - Características bioquímicas de algumas lipases microbianas

Fonte	Substrato	PH ótimo	T (°C) ótima	Indutor	Atividade Enzimática	Referência
<i>Candida W</i> 3.8	p-Nitrofenil Palmitato (pNPP)	7	45°C	-	2053,3 U/ml	ALAMI <i>et al.</i> , 2017
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de arroz	-		Azeite de oliva	282 U/ml	PUTRI <i>et al.</i> , 2020
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Tegumento de manga	5	27°C	-	3500 U/L	PEREIRA <i>et al.</i> , 2019

<i>Bacillus subtilis</i>	p-Nitrofenil Palmitato (pNPP)	8	37°C	Azeite de oliva	882 U/mg	SARASWAT <i>et al.</i> , 2018
<i>Serratia marcescens</i>	p-Nitrofenil Palmitato (pNPP)	8	50°C	-	80 U/ml	GARCÍA-SILVERA <i>et al.</i> , 2017
<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	p-Nitrofenil Palmitato (pNPP)	7	50°C	Azeite de oliva	3368 U/mg	PHUKON <i>et al.</i> , 2020
<i>Sphingobacterium sp</i>	-	7	37°C	Azeite de oliva	507,133 U/mg	SATTI <i>et al.</i> , 2019
<i>Cryptococcus flavescens</i>	-	6	25°C	Tween 20	0,66 U/ml-min	ELEGADO <i>et al.</i> , 2019
<i>Aspergillus niger</i>	Torta de dendê	-		Borra alcalina de dendê	72,57 U/gss	PENHA <i>et al.</i> , 2015
<i>Penicillium citrinum</i>	Óleo de soja	8	45°C	Azeite de oliva	271,67 U/g	LIMA <i>et al.</i> , 2019b
<i>Aspergillus terreus</i>	Óleo de mostarda	6	50°C	Azeite de oliva	942.17 U/mg	SETHI; NANDA; SAHOO, 2016
<i>Halomonas sp</i>	p-nitrofenil laurate	6,9	21°C	-	250 U/L	GUTIÉRREZ-ARNILLAS <i>et al.</i> , 2016
<i>Pleurotus ostreatus</i>	pNP decanoato	7	30 ± 60 ° C	-	4000 U/L (PleoLip241) 700 U/L (Pleo- Lip369)	PISCITELLI <i>et al.</i> , 2017
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Resíduos de coco	6,5	30°C	Óleo de coco	698,1 U/g	VENKATESA GOWDA <i>et al.</i> , 2014
<i>Rhizopus oryzae</i>	Farelo de trigo	6 (SSF)		Azeite de oliva	62,67 U/ml (SmF)	HERMANSY AH; ANDIKOPUT

		5,5 (SmF)			50 U/ml (SSF)	R; ALATAS, 2019
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bolo de amendoim	6	28°C	-	74,117 U/ml	NEETHU <i>et al.</i> , 2015

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

O oceano tem sido visto como um ambiente favorável para obtenção enzimática, existindo uma grande diversidade microbiana neste local favorecendo a obtenção de enzimas com características atraentes como estabilidade diante de várias faixas de pH, temperatura, e em condições de pressão e salinidade (NAVVABI *et al.* 2018). As lipases oriundas de microrganismos marinhos vêm sendo exploradas nos últimos tempos, essas fontes são promissoras uma vez que esses microrganismos possuem atividade em condições extremas (PATNALA *et al.*, 2016). Um estudo realizado por Balduyck *et al.*, 2015, envolveu a análise de duas espécies de microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Tisochrysis lutea*, as lipases desses microrganismos marinhos exibiram alta atividade a uma temperatura de 20°C. Algumas lipases apresentam amplo perfil de temperatura e pH, como reportado por Latip *et al.*, (2016) que investigaram as propriedades da lipase de *Pseudomonas* da Antártica. A lipase produzida pela bactéria revelou ser termoestável em um intervalo de 10-70°C, com relação ao pH sua estabilidade mostrou-se em uma ampla faixa de 5,0 a 10,0, sendo seu pH ótimo igual a 8.

#### 2.1.2.4 Produção de lipases: tipo de fermentação e nutrientes

A fermentação submersa (FS) bem como a fermentação em estado sólido (FES) são processos empregados na produção enzimática, nas quais os substratos envolvidos irão depender do tipo de fermentação escolhida. Na FS os substratos encontram-se dissolvidos no meio líquido, enquanto que na FES é utilizado substratos de natureza sólida (FICARRA *et al.*, 2016). As lipases são enzimas conhecidas por sua ampla especificidade a diversos substratos (JAVED *et al.* 2018; BOROWIECKI *et al.* 2017; KUMAR *et al.*, 2016). Essa capacidade em atuar em diversos substratos é uma característica significativa das lipases e o seu rendimento enzimático é condicionado ao substrato empregado, alguns dos seus substratos são triacilglicerídeos, ésteres de ácidos graxos, lipídios, óleos sintéticos e naturais (NEGI, 2018).

Geoffry e Achur (2018b) utilizaram o efluente da fábrica de óleo de palma como substrato, e obtiveram alta atividade de lipase (7,8 U/ml), revelando dessa maneira que o

efluente da fábrica de óleo de palma é uma boa alternativa para substrato. A lipase produzida por *Streptomyces* sp. apresentou um bom potencial nos processos catalíticos, contudo a sua produção enzimática mostrou-se levemente baixa, diante disso em uma tentativa de otimizar as condições do processo fermentativo Lan *et al.*, (2016) empregaram o 4-nitrofeniloctanoato como substrato e juntamente com os outros parâmetros otimizados o nível de expressão da lipase aumentou para 442 U/mL. O uso de torta de amendoim mostrou ser um substrato promissor para a produção de lipases por *Aspergillus niger*, conforme estudo produzido por Salihu, Bala e Alam (2016). Na intenção de reduzir os custos envolvidos na obtenção enzimática, Rodrigues *et al.*, (2015) utilizaram como substratos farelo de sementes de gergelim (*Sesamum indicum*), de girassol (*Helianthus annuus*) e de linhaça (*Linum usitatissimum L.*), por dispor de alto valor lipídico, para ambos os substratos foram constatadas produção da enzima, contudo a produção máxima (160U) ocorreu quando utilizado as sementes de girassol.

Na produção das lipases microbianas independentemente do tipo de fermentação empregada devem ser selecionadas fontes de carbono e nitrogênio como nutrientes. Esses fatores nutricionais implicam diretamente na produtividade enzimática (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019). Durante o processo de produção da lipase o meio deve ser rico em nutrientes com o intuito de se obter melhores rendimentos enzimático, fontes de carbono como glicose, xilose, maltose, lactose, sacarose e glicerol e outros compostos podem ser adicionados (MORAIS *et al.*, 2016). Inúmeros óleos são descritos como fonte de carbono para a produção lipídica, entretanto a utilização de azeite de oliva, óleo de palma, óleo de girassol e óleo de amêndoa apresentou maiores rendimentos enzimáticos no trabalho relatado por Colla *et al.* (2016). A síntese das lipases microbianas é controlada por diversas condições, contudo a fonte de carbono empregada no processo é o fator determinante para a quantidade de enzima produzida pelo microrganismo (DOBREV *et al.*, 2015).

A literatura apresenta vários estudos onde diferentes fontes de carbono são testadas para a produção de lipase, Jesus *et al.*, (2016) avaliaram a produção da lipase pelo *Bacillus subtilis* utilizando a manipueira como fonte de carbono, o que revelou ser uma boa fonte alternativa visto que exibiu atividade lipásica em um meio em que não houve adição de indutores. Castiglioni, Costa e Alegre (2018), evidenciaram um efeito positivo na atividade da lipase produzida por *Burkholderia cepacia* quando as concentrações do óleo de soja foram aumentadas, mostrando dessa maneira que o óleo de soja é uma boa opção nutritiva. Castro *et al.* (2017) em seu estudo, analisaram a produção de lipase pelo fungo *Aspergillus westerdijkiae* e em seu experimento foi realizado uma comparação da produção enzimática em um meio suplementado com azeite de oliva como fonte de carbono e outro meio sem a adição do azeite.

Seus resultados mostraram que o rendimento da atividade de lipase foi em média de 40.000 U/g em meio contendo 1% azeite de oliva, entretanto, uma redução da atividade foi verificada quando o fungo foi cultivado sem a presença do azeite de oliva, apresentando um rendimento de apenas 12.000 U/g.

A implementação de fontes de nitrogênio apropriadas é crucial ao processo fermentativo, a adição desses nutrientes implica diretamente no crescimento celular bem como na produção enzimática (GOTTSCHALK *et al.*, 2013). As fontes de nitrogênio são utilizadas com o intuito de favorecer o desenvolvimento microbiano e entre as mais aplicadas estão, o licor de maceração de milho, farinha de soja, extrato de fermento, peptona, ureia, nitrato e sais de amônio (SINGH *et al.*, 2016). Muitos autores fazem o uso de extrato de levedura como fonte de nitrogênio (AAMRI *et al.*, 2020; LIMA *et al.* 2019b).

Penha *et al.* (2015) em seu experimento concluíram que a utilização de torta de dendê pura foi um substrato incompleto para a produção de lipases por *A. niger* 11T53A14, contudo a adição de solução de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio foi capaz de influenciar positivamente a produção de lipase. Um estudo desenvolvido por Salwoom *et al.* (2019), teve como um de seus objetivos analisar fatores nutricionais envolvidos na produção de lipase por cepas bacterianas obtidas do solo da Ilha Signy. Nesse estudo foram testadas várias fontes de carbono (sacarose, maltose, lactose, glicose e arabinose) e nitrogênio (caseína, extrato de levedura, peptona, triptona) no entanto somente a adição da glicose como fonte de carbono aumentou significamente a atividade da enzima em comparação com a média, a utilização das demais fontes de carbono diminuíram a produção da lipase em mais de 50%, com relação as fontes de nitrogênio empregadas. Foi constatado que um pequeno aumento na produção de lipase ocorreu mediante a presença da peptona e a aplicação da outras fontes de nitrogênio resultou em uma leve diminuição na atividade enzimática quando comparado com a produção média.

Para atingir uma boa atividade enzimática vários pontos devem ser levados em consideração, um deles é a presença e escolha ideal de indutores, essa variável deve ser explorada pelos pesquisadores com o intuito de aumentar a produção da lipase (SOLEYMANI *et al.*, 2017). Durante um estudo com fungos do gênero *Aspergillus* Reinehr *et al.* (2016), testaram a produção das lipases fúngicas frente a dois indutores, o óleo de soja e o glicerol, seus resultados mostraram que maiores atividades de hidrólise foram encontradas utilizando-se como indutor 2% de óleo de soja com valores de atividade de 7,69 U/g (*A. fumigatus*), 1,03 U/g (*A. niger*) e 24,17 U/g (*A. niger* O-4). Patel *et al.* (2020) otimizaram a produção da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*, em seus experimentou analisando vários óleos como indutores,

dentre os óleos vegetais empregados o melhor indutor para a produção de lipase foi o óleo de oliva, uma redução de 15,8% na atividade foi verificada quando o indutor foi substituído pelo óleo de coco, os demais óleos utilizados foram classificados em ordem decrescente para a produção de enzimas; óleo de mamona > óleo de amendoim > óleo de semente de algodão > óleo de girassol. Concentrações excessivas de lipídeos no meio de crescimento podem resultar em efeitos citotóxicos para o microrganismo (ZAREVUCKA, 2012). Prabaningtyas *et al.* (2018) descreveram a produção de uma lipase fúngica, em seu estudo foi avaliado a produção enzimática frente a várias concentrações do indutor (2%, 4%, e 8% g/g de meio de cultivo), a maior atividade lipásica (163,33 U/g de meio de cultivo) foi obtida quando adicionado 4% do indutor no processo fermentativo.

Outro fator que pode interferir na produção de lipases é a agitação do meio de cultivo (COLLA *et al.*, 2016). Com intenção de otimizar parâmetros para a produção lipase de *G. thermoleovorans* DA2, Fotouh, Bayoumi e Hassan (2016) submeteram a taxa de agitação em diferentes rotações por minuto, como 40, 80, 120 e 150 rpm. Como resultado a atividade máxima da lipase (1021,91 U/mL) foi verificada a 120 rpm, nas demais rotações foi observado uma redução na atividade da enzima. A produção de lipase por *Bacillus cereus* HSS foi analisada por Hassan, Latif e Ali (2018), a produção foi avaliada em condições estáticas e sob agitação a 120 rpm, em seus resultados observaram que a atividade máxima da lipase foi de 285 U/mL, sob condição de agitação, e 225 U/mL em modo estacionário.

#### 2.1.2.5 Lipases produzidas por microrganismos isolados de resíduos industriais

Microrganismos com capacidade de produzir lipases podem ser encontrados em diversos ambientes, principalmente em resíduos industriais (CORTEZ *et al.*, 2017). Esses efluentes industriais são caracterizados como regiões que favorecem o crescimento e desenvolvimento de microrganismos, pois essas áreas contêm altas concentrações de ácido graxos livres que podem ser assimilados como nutrientes e substratos para o seu metabolismo (PADILLA; TABAREZ; ORDUZ, 2017). Peil *et al.* (2016) tiveram como objetivo em seu estudo, realizar o isolamento de microrganismos com capacidade de produzir lipases em diferentes efluentes de indústrias. As amostras foram coletadas em matadouros e indústrias de laticínios, 21 bactérias e 7 fungos foram isolados, a produção de lipase extracelular foi observada em 71,43% das bactérias e 57,14% dos fungos.

A produção de lipases por microrganismos isolados em resíduos de refinarias de óleo vegetal e de petróleo foram investigadas por Sperb *et al.* (2015). Foram isolados 24 fungos e

esses microrganismos foram submetidos a testes qualitativos para presença de lipases, contudo apenas três testaram positivo para atividade lipásica, sendo eles o *Aspergillus niger* e duas espécies de *Rhizopus sp.*. Padilla, Tabarez e Orduz (2017) coletaram amostras de efluentes industriais contaminados com óleos vegetais e realizaram o isolamento de microrganismos. Nesse estudo foi avaliado a atividade enzimática lipásica sob diversas condições de temperatura e pH. Ao todo 149 microrganismos foram isolados, todavia somente 37 mostraram atividade lipásica. Para a produção da enzima foi utilizado o azeite de oliva como substrato e o pH ótimo para a atividade da enzima foi 8.0 a uma temperatura de 37°C.

Com o propósito de isolar leveduras com capacidade de produzir lipases Salgado *et al.* (2019) utilizaram águas residuais dos moinhos de azeite como fonte para se obter microrganismos, foram isolados 32 leveduras e cinco isolados foram submetidos a testes para determinação da atividade extracelular da lipase. O azeite de oliva foi utilizado como suplementação no meio líquido sintético (YEP), mas apenas o isolado JT5 mostrou um máximo de atividade de lipase 0,85 U/mL, sendo que a identificação da cepa revelou a levedura *Magnusiomyces capitatus*. A produção máxima da enzima pelo microrganismo mencionado foi realizada usando o próprio efluente como substrato e suplementado com extrato de levedura e azeite de oliva como fonte de carbono.

Resíduos industriais do óleo de palma (torta de palma, casca e a fibra da palma) foram coletados para isolamento de microrganismos com atividade lipásica por Kuncharoen *et al.* (2020), sendo isoladas 16 leveduras. No entanto, a espécie *Trichosporon insectorum* 4E-1D, foi a melhor produtora de lipase em óleo de palma e óleo de soja como fonte de carbono ( $28,19 \pm 4,84$  U/mL em óleo de palma e  $22,63 \pm 0,18$  U / mL em óleo de soja). Um efluente industrial rico em matéria orgânica é a vinhaça, conhecida como um resíduo líquido oriundo de destilarias resultantes do processo de fermentação realizado principalmente por indústrias sucroalcooleiras (CAZETTA; CELLIGOI, 2005). Esse resíduo industrial foi utilizado por Guan *et al.* (2020) que tiveram como objetivo realizar o isolamento de novos *Lactobacillus* com atividade lipásica. Três cepas foram isoladas e submetidas a atividade da lipase utilizando azeite de oliva como substrato. As atividades lipásica das três estirpes variaram entre 5,88 a 17,79 U/mL. Padma e Vasudevan (2018) coletaram amostras de tanques residuais do mercado de vegetais na intenção de isolar microrganismos proteolíticos e lipolíticos. O isolado com capacidade de produzir lipase foi descrito como uma bactéria do gênero *Bacillus*, no entanto o estudo não contou com uma análise quantitativa da produção enzimática.

As águas residuais de laticínios são caracterizadas como ambientes propícios ao desenvolvimento microbiano e foi alvo de estudo por Ficarra *et al.* (2016), que utilizou essas

águas residuais como fonte microbiana para isolar produtores de lipases. Ogunnusi e Olorunfemi (2018) isolaram bactérias lipásicas em efluentes de matadouro e amostras de esterco de vaca. Foram obtidos ao todo 12 isolados, sendo sete adquiridos nos efluentes de matadouro, as bactérias foram testadas para a produção da lipase e um caldo suplementado com óleo foi usado como meio de produção, através da fermentação submersa. A bactéria com maior atividade lipásica foi identificada como *Pseudomonas aeruginosa* ( $6.0 \times 10^{-3}$  mg/ml) o estudo demonstrou o potencial que esses resíduos têm como fonte de produção enzimática. Resíduos de óleo de palma foram empregados para o isolamento de bactérias produtoras de lipase, os microrganismos foram submetidos ao processo fermentativo e os autores Hasan *et al.*, (2018) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Sete isolados bacterianos foram obtidos e um isolado do gênero *Bacillus* sp. teve o rendimento máximo de  $0,168 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$  utilizando o óleo de palma como fonte de carbono, já com relação a fonte de nitrogênio a adição da triptona ao meio forneceu a maior atividade enzimática ( $0,135 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$ ). O pH e temperatura ótima para o processo fermentativo foram 7 e  $37^\circ\text{C}$  respectivamente.

Com base nesses estudos é possível dizer que o crescimento e desenvolvimento microbiano ocorre em uma diversidade de ambientes com características distintas, entre eles, os resíduos industriais vêm sendo fortemente explorados por serem uma ótima fonte de microrganismos. Os resultados em sua grande maioria positivos levam muitos autores a buscar novos microrganismos produtores de lipases.

Figura 2 - Segmentos e industriais com águas residuais ricas em matérias orgânicas de onde podem ser isolados microrganismos produtores de lipases.



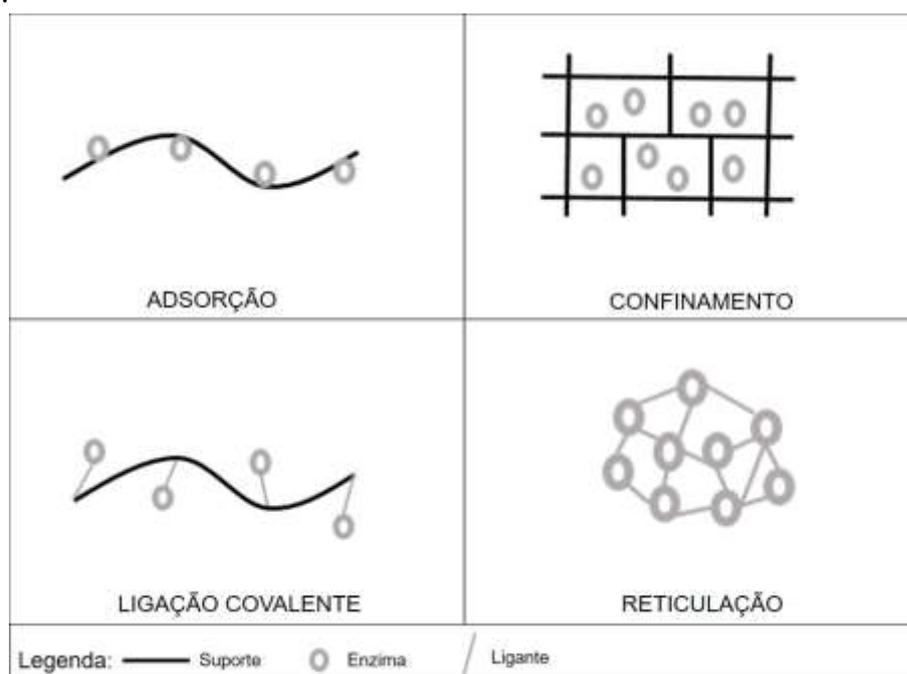
Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

### 2.1.2.6 Imobilização de enzimas

O uso de enzimas na área industrial tem sido dificultado por alguns fatores negativos associados a essas biomoléculas, sua possibilidade de desnaturação devido sua baixa estabilidade e complexidade na recuperação da enzima para uso consecutivo inviabiliza a sua utilização na forma livre pelas indústrias (SIRISHA *et al.*, 2016). Para solucionar essas adversidades as técnicas de imobilização enzimática têm por finalidade facilitar as etapas de separação, recuperação, uma vez que uma desvantagem associada ao uso de enzimas na forma livre é a sua baixa estabilidade frente a parâmetros como temperatura e pH (SARNO *et al.*, 2017). Esse processo de imobilização baseia-se em uma interação estabelecida entre a proteína e a superfície de uma matriz insolúvel (suporte sólido) (ES, VIEIRA, AMARAL, 2015).

Os métodos de imobilização enzimática incluem adsorção, ligação covalente, confinamento/encapsulação e reticulação como demonstrado na figura e tabela 6 (SOUZA *et al.*, 2017). Com relação as técnicas de imobilização não há uma metodologia que possa ser empregada para todas as enzimas, para determinação do método deve-se considerar alguns pontos como simplicidade em realizar o procedimento, ter um baixo custo, a escolha de um procedimento que proporcione uma atividade catalítica satisfatória além de uma técnica que permita uma boa estabilidade operacional (RESENDE, SCPOOL, FRANÇA 2016).

Figura 3 - Métodos de imobilização de enzimas: adsorção, confinamento, ligação covalente e reticulação.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Uma técnica de imobilização que tem atraído cada vez mais atenção é a abordagem conhecida como CLEAs (Cross-Linked Enzyme Aggregates), tem se mostrado um método vantajoso visto que sua metodologia é relativamente simples e de tempo reduzido para execução (CUI *et al.*, 2017). Proposta por Sheldon (2011), os CLEAs possuem particularidade interessantes desejadas nas biotransformações industriais, seu método é bastante acessível, não requer uso de transportadores, duas ou mais enzimas podem ser co-imobilizadas, custo economicamente baixo, permite a retenção de altas atividades enzimáticas bem como boa estabilidade térmica, além de uma melhor tolerância a solventes orgânicos. Na literatura há relatos da utilização do CLEAs para imobilizar uma ampla gama de enzimas como lipases (MULEY *et al.*, 2021), celulases (PODREPLEK; KNEZ; LEITGEB, 2019), proteases (ASGHER; BASHIR; IQBAL, 2018), beta-galactosidase (ULRICH *et al.*, 2017), amiloglucosidase (AMARAL-FONSECA *et al.*, 2018), lacase (HONG *et al.*, 2021), acetilesterase (DORAISWAMY; SARATHI; PENNATHUR, 2019).

Os CLEAs baseiam-se em duas fases, primeiramente a enzima é precipitada pelo uso de agentes precipitantes, como sais inorgânicos, polímeros, solventes orgânicos entre outros, seguida de uma reticulação por agentes reticuladores, entre eles o mais empregado é o glutaraldeído como reagente bifuncional, ou por agentes multifuncionais através da reação com os grupos aminos presente na superfície enzimática (BILAL *et al.*, 2018). Além disso esse método tem o conveniente de aliar a purificação e imobilização em uma única etapa o que torna todo o procedimento mais rápido e simples (SAMOYLOVA *et al.*, 2018).

O uso de proteínas alimentares é uma alternativa quando a enzima apresenta baixo teor de resíduos de grupos amino em sua superfície, dessa maneira para melhorar o processo de reticulação a adição de substâncias que contém grandes quantidades de grupos amino como albumina do soro bovino é implementada, essas substâncias são chamadas de co-alimentadores (CUI; LIU; LI, 2016). Mafra *et al.* (2016) avaliaram a concentração necessária de albumina de soro bovino (BSA) (20, 40 e 60 mg) para imobilização da catalase, em uma análise comparativa da imobilização da enzima com e sem o BSA foi evidenciado que uso de BSA diminui a resistência à transferência de massa, e o fator eficácia foi 3,7 vezes maior quando utilizado a albumina de soro bovino. Dois co-alimentadores foram estudados por Goetze *et al.* (2017) farinha de pena e BSA na preparação combi-CLEAs para clarificação de suco de uva, ambos os alimentadores mostraram efeitos positivos na recuperação da atividade da enzima pectinase, no entanto maiores recuperações de atividade foram vistas empregando a farinha de pena, isso reflete em um resultado vantajoso, uma vez que um alimentador mais barato que o BSA pode

ser utilizado com grande eficiência na imobilização da pectinase.

Há vários trabalhos publicados referente a imobilização de lipases utilizando o CLEAs, Picó *et al.* (2018) imobilizaram a lipase B de *Candida antarctica* pelo método de CLEAs utilizando o sulfato de amônio e glutaraldeído, a reutilização da enzima foi bastante satisfatória, conversões de biodiesel foram possíveis até 10 ciclos catalíticos mantendo 100% da atividade inicial. Em um outro estudo a lipase de *A. niger* foi precipitada utilizando o sulfato de amônio e a reticulação ocorreu pela primeira vez adicionando o Tripolifosfato de sódio (TPP), o uso do TPP obteve resultados favoráveis visto que proporcionou enzimas altamente estáveis em uma faixa mais ampla de temperatura e pH quando comparado as enzimas livres (QIAN *et al.*, 2020).

CLEAs e combi-CLEAs é um método de imobilização promissor, principalmente devido ao fato de não requisitar a necessidade de utilizar enzimas previamente purificadas, contudo é necessário a otimização dos parâmetros de precipitação e reticulação e as interações entre si, a sua capacidade em melhorar a estabilidade enzimática irá certamente beneficiar os bioprocessos nas aplicações industriais (XU *et al.*, 2018).

Tabela 6 - Métodos de imobilização enzimática e diferentes tipos de suporte.

Enzima	Método	Suporte	Referência
Lipase	Adsorção e ligação covalente	Carvão ativado e carvão ativado funcionalizado.	GONÇALVES, G. <i>et al.</i> , 2021.
Peroxidase	Adsorção física e ligação covalente	Bagaço cana de açúcar	QUEIROS, M. <i>et al.</i> , 2018.
A-amilase	Adsorção e ligação covalente	Cloisita 30B	AGHAEI, H. <i>et al.</i> , 2022.
B-galactosidase	Adsorção física	Haloisita	TIZCHANG, S. <i>et al.</i> , 2021.
Urease	Ligação covalente	Nanopartículas magnéticas amino-funcionais	JANGI, S. <i>et al.</i> , 2020.
Lacase	Ligação covalente	Polímero de poli(fluoreto de vinilideno)	ZHU, Y. <i>et al.</i> , 2020.
$\alpha$ -amilase e	Reticulação	Suportes porosos de	FROTA, E. <i>et al.</i> , 2020.

glicoamilase		gelatina reticulados	
$\beta$ -galactosidase	Reticulação	Sem suporte	XU, M. <i>et al.</i> , 2020.
Xilanase	Reticulação	Esferas de alginato de cálcio	KUMAR, S. <i>et al.</i> , 2017b.
Ciclodextrina			
Glucosiltransferase	Reticulação	Sem suporte	ROJAS, M. <i>et al.</i> , 2019.
Esterase	Reticulação	Sem suporte	SAMOYLOVA, Y. <i>et al.</i> , 2018.
$\alpha$ -glicosidase	Encapsulamento	Rede cristalina de ZIF-8	WAN, G. <i>et al.</i> , 2021.
Catalase e superóxido dismutase	Encapsulamento	Esferas de alginato	DANIAL, E.; MAHA, A., 2020.
Glicose isomerase	Encapsulamento	Alginato, quitosana e ágar.	SINGH, T.; JAJOO, A.; BHASIN, S., 2020.
Lacase	Adsorção - encapsulamento	Zeólito imidazolato framework-67	WANG, Z. <i>et al.</i> , 2020.
Lipase	Encapsulamento	Lentikats	GUARJADO, N.; AHUMADA, K.; MARIA, P.B., 2020.

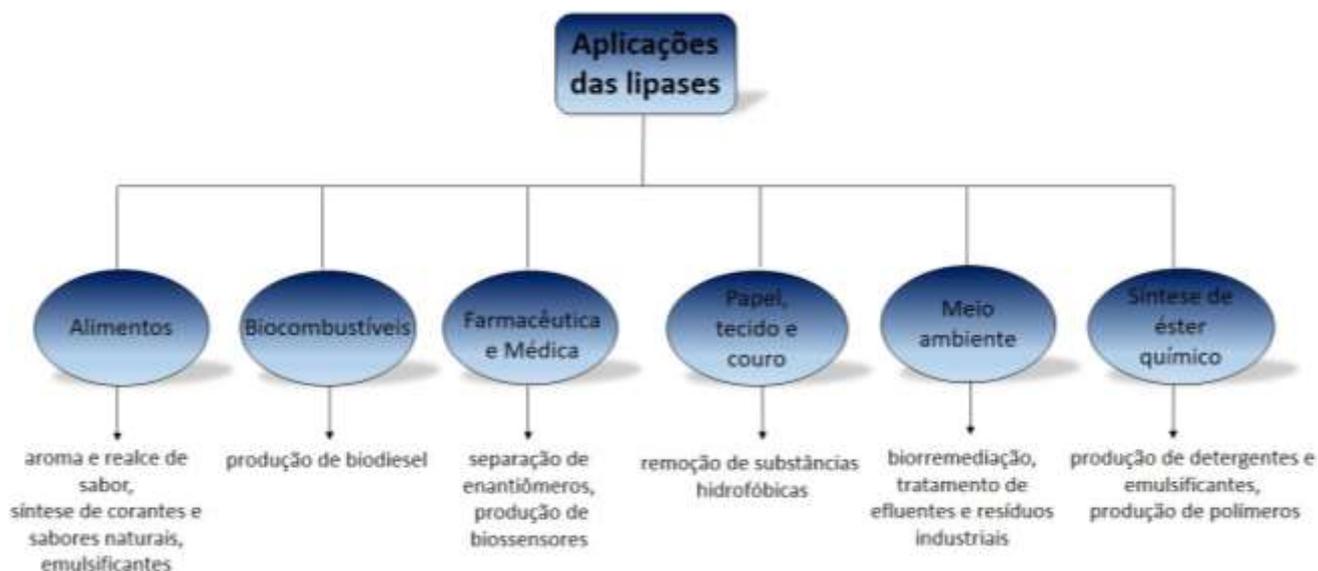
---

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

### 2.1.2.7 Aplicações industriais

A utilização das enzimas microbianas nas indústrias é uma alternativa que vêm crescendo consideravelmente, principalmente devido a sua utilização no setor alimentício, como no processamento de carnes, na indústria de laticínios, produção de bebidas, panificação e na indústria de produtos de limpeza (MARKETS E MARKETS, 2018). Dentre as enzimas industriais as lipases se destacam com sua versatilidade devido as suas propriedades exclusivas (BORELLI; TRONO, 2015). São enzimas amplamente empregadas na área biotecnológica, na produção de biodiesel, formulação de medicamentos, indústrias de alimentos e detergentes (YADAV *et al.* 2017). Outros setores também se beneficiam com a utilização da lipase, como produção de cosméticos, indústrias têxteis e de couro (AVHAD; MARCHETTI, 2019).

Figura 4 - Aplicabilidades da lipase nos setores industriais.



Fonte: Adaptado de GONÇALVES FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019.

#### 2.1.2.7.1 Lipases na indústria alimentícia

A indústria alimentícia tem feito o uso da lipase para uma série de processos, que inclui aumentar a qualidade e o rendimento dos alimentos, proporcionar aromas a determinados produtos e atuar na remoção de óleos e gorduras. Sua aplicação na área de alimentos está relacionada a produtos lácteos, panificação, cervejarias, processamentos de carnes em geral, entre outros (NEGI, 2018). Na indústria láctea a lipase atua na hidrólise da gordura presente no leite. Outra função atribuída a essa enzima é a de realçar o sabor do queijo e acelerar o seu processo de amadurecimento (MEMARPOOR-YAZDI; KARBALAEI-HEIDARI; KHAJEH, 2017). Biolipólise é um processo onde lipases são incorporadas, essa técnica tem por objetivo remover a gordura presente nas carnes durante seu processamento a fim de obter carne magras, sendo empregada com frequência em carnes de peixes. Além disso, lipases microbianas têm sido utilizadas para refinar o sabor do arroz e há ainda uma grande abordagem para a aplicação da lipase na produção do ômega-3 (KUMAR *et al.* 2017a).

Substâncias aromatizantes como ésteres são elementos que podem ser incorporados tanto na área alimentícia como na cosmética e na farmacêutica. Fontes naturais como frutas dispõem desses ésteres, no entanto o seu rendimento é pouco e conforme o processo de amadurecimento da fruta sua composição é afetada, dessa maneira a utilização de enzimas se tornou uma alternativa bastante viável para a síntese desses ésteres aromáticos (SU *et al.*, 2016). As lipases são poderosos biocatalizadores que atuam na produção de ácidos graxos poli-

insaturados, e síntese de ésteres e álcoois. Esses compostos gerados pela ação da lipase são empregados na produção de alimentos saudáveis e até mesmo na formulação de suplementos alimentares (SALIHU; ALAM 2015). Souza, Ribeiro e Coelho (2019) utilizaram a lipase de *Yarrowia lipolytica* obtida por fermentação submersa utilizando farelo de soja para realizar a síntese de diversos ésteres aromatizantes com valor comercial na indústria alimentícia.

Outra função muito importante associada a lipase é sua utilização com o intuito de prolongar a vida útil em alguns produtos de prateleira, como produtos de panificação, atuando na melhoria do sabor de sucos, sopas, molhos, queijos e alimentos assados. É evidenciado que algumas propriedades do macarrão são aprimoradas com a adição da lipase (RAY, 2012). Cao *et al.* (2014) em seu estudo notou o melhoramento do queijo azul por meio da aplicação da lipase, que influenciou no aroma característico do queijo, além de sintetizar metil cetonas, que contribuiu para o sabor típico desse alimento. Uma pesquisa realizada por Schaffarczyk, Ostal e Koehler (2014) avaliaram a influência da aplicação da lipase durante um processo de panificação, a adição dessa enzima resultou em um aumento no volume do pão de 56 a 58%, dependendo do tipo e da concentração da lipase adicionada. Algumas lipases tem sua aplicação em diversos setores, como o caso da lipase de *Candida rugosa* (CRL) sendo empregada para auxiliar no aroma e sabor, e na indústria de gorduras e óleos, além de ser utilizada em outras áreas (MELIS *et al.*, 2017).

#### 2.1.2.7.2 Lipases na produção de biodiesel

A busca por energias renováveis vem sendo explorada nos últimos tempos principalmente para substituir o uso das não renováveis, uma vez que esses recursos se encontram em estado de esgotamento. A produção do biodiesel pela utilização de enzimas recebeu destaque por se tratar de um processo altamente viável e ecológico, sendo que óleos e gorduras degradáveis com alto teor de ácidos graxos livres (FFA) são utilizados para a produção do biodiesel. Esses compostos através das reações de esterificação e transesterificação mediados por biocatalisadores como as lipases são convertidos tendo como produto final o biodiesel (SANDOVAL *et al.*, 2017).

As lipases de *Burkholderia cepacia*, *Rhizomucor miehei* e *Candida rugosa* foram descritas por Fan *et al.* (2017) como catalisadores promissores para a produção do biodiesel e uma comparação da produção do biodiesel foi realizada utilizando óleo de soja e óleo vegetal residual pelas três lipases em questão. Como resultado foi evidenciado que o óleo vegetal residual pode ser efetivamente convertido em biodiesel pela lipase da *R. miehei* através do

processo de transesterificação. Iuliano *et al.* (2020) utilizaram a lipase de *Candida rugosa* para produzir biodiesel, sua metodologia envolveu a conversão de grãos usados de cervejeiros em biodiesel, na presença de metanol. Foram obtidos bons resultados, um alto rendimento foi verificado (98%), e o processo ainda contou com um baixo custo, uma vez que o catalisador se mostrou efetivo na reutilização após quatro ciclos. Conforme Amini *et al.* (2017), o biodiesel pode ser produzido por óleo de semente de *Ocimum basilicum*, com grande potencial significativo como uma nova fonte de biodiesel, a produção foi feita usando lipase imobilizada (Novozym 435) e metanol, foi observado a reutilização da lipase imobilizada em até sete ciclos.

A utilização das lipases como biocatalisadores nos processos de produção do biodiesel é um recurso eficaz, no entanto algumas desvantagens são associadas a essa prática, o biodiesel gerado por essa metodologia tem baixo rendimento e seu uso em máquinas pode acarretar em danos a esses equipamentos, além disso, em uma das últimas etapas final produção há uma dificuldade em separar o biocatalisador e o metanol que não reagiu durante o procedimento do biodiesel gerado, esse composto final deve ser submetido a técnicas para remover as impurezas na intenção de obter um combustível de qualidade (PÉREZ *et al.*, 2019).

Entretanto muitos trabalhos retratam resultados promissores com o uso das lipases como catalisadores na produção do biodiesel como no estudo desenvolvido por Costa *et al.*, (2020), onde investigaram a produção do biodiesel através das reações de hidrólise e esterificação, as lipases de *Geotrichum candidum* foram aplicadas na hidrólise do óleo de soja, a etapa seguinte de esterificação dos ácidos graxos livres foi mediada pela lipase imobilizada de *Pseudomonas fluorescens* (PEL). O mecanismo de hidroesterificação aplicado nesse trabalho produziu biodiesel de alta qualidade, as reações apresentaram boa viscosidade e pureza, as reações de hidrólise mostraram conversão completa do óleo de soja em um curto período de tempo e os ácidos graxos livres não exigiu a necessidade de purificação o que é um ponto positivo pois contribui para redução do custo envolvido. A síntese de biodiesel pelo processo de transesterificação catalisada por lipase de *Aspergillus niger* foi estudada por Shalini *et al.* (2021), a enzima imobilizada reportou um rendimento total do biodiesel de 90%, podendo ser utilizada repetidamente cinco vezes na síntese de biodiesel sem perda de sua atividade, sendo considerado um catalisador eficiente na produção de biodiesel. A realização de estudos em escala de laboratório, projetos piloto bem como a otimização dos processos, vêm trazendo avanços na área dos catalisadores, o desenvolvimento desses estudos oferecem melhorias na atividade bem como na produtividade enzimática (PASHA *et al.*, 2021).

O uso das lipases como biocatalisadores envolve uma série de vantagens, apesar disso ainda se faz necessário estudar as metodologias já existentes e pesquisar novos métodos para

ampliar a utilização das lipases na produção desse biocombustível (SANKARAN; SHOW; CHANG, 2016).

#### 2.1.2.7.3 Lipases na indústria farmacêutica

No setor farmacêutico a produção de enantiômeros puros é uma das metodologias mais significativas, devido ao fato de que uma grande porcentagem das drogas em andamento são quirais, assim essa produção de enantiômeros puros é mediada pela ação dos biocatalisadores, em especial as lipases (SAWANT *et al.*, 2016). Esse processo também pode ocorrer através de métodos químicos, no entanto o uso dos catalizadores enzimáticos é preferível em função da sua eficiência e seletividade e outro fator positivo associado a sua utilização é a grande quantidade de enantiômeros produzida (BHARDWAJ; GUPTA, 2017).

As lipases já foram descritas na literatura para a produção de enantiômeros, composto usado para a produção de ibuprofeno, utilizando lipase de *Rhodothermus marinus* (MEMARPOOR-YAZDI; KARBALAEI-HEIDARI; DOROODMAND, 2018) atenolol, produção mediada por lipase de *Candida rugosa* (SIKORA *et al.*, 2017) e milnaciprano, medicamento utilizado na terapêutica da fibromialgia (SANFILIPPO; NICOLSI; PATTI, 2014). Outras drogas como nebacetin, naproxeno, ácido ascórbico, derivados de quinolonas, cetroprofeno, cloranfenicol são descritas como medicamentos produzidos utilizando diferentes tipos de lipases (CARVALHO *et al.*, 2015).

A grande utilização dessas enzimas na área farmacêutica se deve ao fato das suas características de regioseletividade e estereoespecificidade, que são atributos de interesse nos biocatalisadores nas reações de síntese de produtos farmacêuticos (STAUCH; FISHER; CIANCI, 2015). Presume-se que o processo de biocatálise será futuramente abordado com mais ênfase na produção de medicamentos e intermediários farmacêuticos (SUN *et al.*, 2018).

#### 2.1.2.7.4 Lipases na indústria de detergentes

As lipases têm inúmeras aplicações, dentre elas destaca-se sua ação na produção de detergentes (PÉREZ *et al.*, 2019). A ação das lipases é quebrar moléculas de triglicerídeos em ácidos graxos, gerando dessa maneira uma menor emulsão, sendo mais fácil assim o seu processo de remoção (RAHMAN *et al.*, 2012). Na indústria de detergentes o meio aquoso é de caráter alcalino e assim, as lipases empregadas na formulação de detergentes devem ser alcalofílicas (BHOSALE, SHAKEEN, KADAM, 2016). A utilização de enzimas na formulação

dos detergentes oferece algumas vantagens como redução do tempo necessário para lavagem e aumento da vida útil de tecidos (UGO *et al.*, 2017).

Estudos comprovam a eficiência da utilização das lipases microbianas para remoção de gordura, como descrito por García-Silvera *et al.* (2018) que utilizaram com sucesso uma lipase de *Serratia marcescens* para remoção do triacilglicerol do azeite em tecido de algodão. Lipases do hepatopâncreas de camarão foram empregadas na produção de detergente, sua efetividade foi comparada a de detergentes para roupas comerciais e resultados positivos foram encontrados (KUEPETHKAEW *et al.*, 2016). Uma lipase produzida por *Bacillus subtilis* mostrou propriedades desejáveis para aplicação na produção de detergentes, por ser altamente resistente a surfactantes, agentes oxidantes e detergentes comerciais, se tornando então alvo potencial para indústrias de limpeza (SARASWAT *et al.*, 2017).

A utilização da lipase alcalina na produção de detergentes poderá diminuir o uso de surfactantes e outros compostos que do ponto de vista ecológico não são favoráveis (NIYONZIMA; MORE, 2015). Uma vez que os detergentes comerciais contêm compostos químicos perigosos, tanto para saúde humana quanto para a ambiental, as lipases vêm sendo uma alternativa para o uso desses ingredientes, além de serem preferíveis por suas características em atuar em temperatura ambiente e prolongar a qualidade tecidual (JAVED *et al.*, 2018).

#### 2.1.2.7.5 Lipases no tratamento de efluentes

Muitos resíduos industriais têm como destino final seu lançamento em ambientes aquáticos, isso resulta em morte da vida aquática, uma vez que esses resíduos contêm alta carga poluente de compostos oleosos, o que impede a difusão do oxigênio na água. Na tentativa de resolver esse problema ambiental enzimas são utilizadas para ajudar a diminuir o teor de óleos e gorduras presentes nesses resíduos (HU *et al.*, 2018).

O tratamento biológico de águas residuais por meio da utilização de lipase produzida por *Aeribacillus pallidus* foi feito por Ktata *et al.* (2019), o tratamento dos efluentes gerado pela indústria de produção de conservas de atum teve alta eficiência (96,11%) quando a lipase foi utilizada, sendo que a hidrólise de águas residuais foi estabelecida em 50°C por 1h. A lipase de *Bacillus sp.* foi avaliada quanto a sua capacidade em hidrolisar gordura em diferentes efluentes industriais (laticínios, padaria e aves), como resultado a enzima se mostrou capaz de hidrolisar mais de 50% da gordura inicial presente em todos esses efluentes, sendo considerada, desse modo, uma boa alternativa no pré-tratamento desses efluentes (BALAJI; CHITTOOR;

JAYARAMAN, 2020). Uma redução de gordura em 3 vezes foi identificada no pré-tratamento do efluente de matadouro, quando foi utilizado a lipase de *Fusarium verticillioides*. A atividade enzimática revelou temperatura e pH ótimos de 45 °C e 5.5 respectivamente, sendo a enzima estável em uma ampla faixa de pH (4,0 a 8,0), sendo essas propriedades fatores desejáveis para aplicações industriais (FACCHINI *et al.*, 2015).

Essa etapa de pré-tratamento por intermédio das lipases é uma possibilidade altamente viável, a hidrólise enzimática permite que a etapa de tratamento seguinte por meio da população microbiana seja mais simples (SOARES *et al.* 2019). O desenvolvimento de estudos e de novas tecnologias correlacionando as enzimas no pré-tratamento dos efluentes industriais, promove uma redução nos custos envolvido nesse processo, além de ser uma prática ambientalmente amigável (GARRIDO; SILVA, 2016).

#### 2.1.2.7.6 Lipases em cosméticos

As lipases vêm sendo empregada na indústria de cosméticos, participando da formulação como compostos ativos ou na catálise de produtos químicos como ésteres, aromas, e agentes ativos (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013). Recentemente, a utilização das lipases nessa área vem sendo explorada e sua função como biocatalisador é aplicada na síntese de ésteres envolvidos na produção de cosméticos. As propriedades das lipases, tais como elevada capacidade catalítica frente a substratos sintéticos e naturais, potencial de atuar em condições moderadas e boa estabilidade em variados solventes orgânicos, faz com que a enzima seja atraente para esse setor (RIOS *et al.*, 2018).

Dentro da enzimocosmética as lipases se mostram eficientes na formulação principalmente de produtos de limpeza e cremes destinados ao tratamento de celulites (BELI; MAGESTE; TAKETANI, 2019). Outra aplicação do seu uso é na elaboração de produtos de emagrecimento, uma vez que essa enzima pode atuar na quebra de depósitos de gordura, produtos para cabelo e maquiagem também são criados por meio da ação lipásica. Até o momento já foram descritas várias sínteses por meio da ação catalítica das lipases e diversos produtos são grandemente comercializados (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013).

Uma preocupação da indústria cosmética é a produção de aromas, que são utilizados em fragrâncias e outros produtos e é um quesito importante principalmente por parte de seus consumidores, dessa maneira a indústria busca alternativas biotecnológicas para desenvolvimento de aromas naturais (BARÁNKOVÁ; DOHNAL, 2016). O aproveitamento dos processos biotecnológicos vem sendo explorado pela indústria de cosméticos e o emprego

da biotecnologia tem como resultado a formulação de novos produtos bem como a otimização de metodologias existentes. A utilização de enzimas nesse setor tem ganhado espaço na intenção de fornecer aos seus consumidores produtos cada vez melhores (DIAS; CARVALHO, 2017).

#### 2.1.2.7.7 Lipases na produção de biossensores

Outra aplicabilidade das lipases na produção de biossensores, pois suas características a tornam atrativas para a confecção desses materiais. Várias lipases microbianas, bem como de animais são empregadas para o desenvolvimento desses dispositivos (PRIYANKA *et al.*, 2019). As vantagens em se utilizar enzima na elaboração de biossensores incluem alta especificidade e seletividade, possibilidade de regeneração, alto rendimento e diagnóstico em tempo real. Muitos biossensores baseados na ação enzimática são utilizados na área da saúde como para o monitoramento doméstico de glicose no sangue (glicosímetro) e analisadores clínicos portáteis (NGUYEN *et al.*, 2019).

A lipase de *Candida antartica* e de *Aspergillus oryzae* foi utilizada por Hasanah *et al.* (2019) para o desenvolvimento de um biossensor óptico para detectar triglicerídeos (TGs). As lipases imobilizadas foram utilizadas para hidrolisar triglicerídeos liberando glicerol e ácidos graxos livres, esse ácido liberado resulta em uma diminuição do pH, a acidez do meio então é detectada pelo sensor óptico de pH. Outros biossensores a base de lipases têm sido descritos na literatura, Zehani *et al.* (2015) elaborou um biossensor enzimático condutométrico utilizando lipase de *Candida rugosa* (CRL), esse equipamento tem como função detectar pesticidas organofosforados (diazinon, metil paration e metil paraoxon) em meio aquoso. Nesse dispositivo a lipase é responsável por catalisar a hidrólise do diazinon. O biossensor teve resultados positivos, uma vez que ele foi capaz de medir concentrações tão baixas quanto 60 µg. Ainda na detecção de pesticidas, um biossensor foi produzido com lipases de *Ceratobasidium* sp. por Barboza *et al.* (2019) para determinação de carbendazim, nesse biossensor a atuação da lipase foi a de hidrolisar o substrato p-nitrofenil acetato (pNPA).

O critério de estabilidade dos biossensores enzimáticos é um ponto positivo requerido nesses aparelhos, sua especificidade é um parâmetro importante para evitar sinais falsos. A criação desses biossensores é um exemplo da associação das ciências biológicas e da engenharia, sendo que sua construção é fator positivo para monitoramento da saúde pelo próprio paciente bem como em âmbito hospitalar (SONAWANE; MANICKAM; BHANSALI, 2017).

#### 2.1.2.7.8 Lipase na indústria têxtil

As lipases são empregadas nas indústrias têxteis, e uma das suas utilizações baseia-se no tratamento do tecido. Alguns tratamentos convencionais empregam substâncias que podem resultar em perda de peso do tecido e maior probabilidade de causar coceira, no entanto a substituição desses compostos pela lipase diminui essa possibilidade de reação bem como a perda do peso tecidual. Esse tratamento enzimático permite melhorar a maciez de determinados tecidos como o poliéster, sendo eficiente na modificação das propriedades do tecido (KUMAR; KUMAR, 2020).

O uso de lipases permite a remoção de óleos e gorduras naturais, sua utilização possibilita um maior nível de tingimento e a limpeza feita por essa enzima proporciona alto grau de hidrofobicidade para têxteis celulósicos. (KALANTZI *et al.*, 2010). Tecidos de poliéster foram tratados com lipases por El-Shemy, El-Hawary e El-Sayed (2015). O tratamento enzimático proporcionou melhor capacidade de tingimento, bem como maior molhabilidade e recuperação de umidade, a ação da lipase não promoveu deterioração do tecido nas condições reacionais. A literatura descreve o uso das lipases na limpeza, restauração e conservação de tecidos históricos (DARWISH *et al.*, 2020).

A vantagem em utilizar enzimas no tratamento tecidual, sobre as metodologias convencionais é que as propriedades do tereftalato de polietileno são mantidas pois as enzimas são proteínas grandes e não adentram o material, e o uso da lipase não promove a corrosão do tecido, efeito esse que ocorre quando outras substâncias são empregadas como tratamentos alcalinos (CHOUDHURY, 2020).

#### 2.1.2.7.9 Lipases na biorremediação

Lipases têm atuação nos processos de biorremediação de resíduos lipídicos (KUMAR *et al.*, 2016). As lipases são empregadas na limpeza e descontaminação de solo contaminado com resíduos gordurosos, sua ação é converter esses contaminantes em substâncias não tóxicas (LARIK *et al.*, 2019). A lipase de *Pseudomonas* sp. foi utilizada por Sahoo, Sahu e Subudhi (2020) para atuar na biorremediação do solo contaminado por hidrocarbonetos provenientes de óleos automotivos. A enzima em questão foi responsável por mediar a degradação desse óleo obtendo-se a degradação de 92,6% do óleo automotivo, demonstrando dessa maneira sua eficácia nesse processo.

Entretanto, algumas desvantagens estão também associadas à utilização das enzimas nas

biorremediações, tais como o alto custo de produção enzimática, a possível inativação da enzima pelas condições empregadas no processo e o pouco conhecido sobre o comportamento enzimático quando associados aos poluentes. Dessa maneira, mais estudos são necessários acerca da utilização enzimática nas biorremediações, visando a otimização dos parâmetros e potencialização da técnica (KUMAR *et al.*, 2020).

Vários setores industriais fazem o uso da biocatálise mediada pela lipase, as metodologias empregadas vêm sendo estudadas e otimizadas. Com a associação da biotecnologia, a engenharia genética e a engenharia de proteínas as lipases vêm sendo aprimoradas, permitindo obter vários produtos de alta qualidade, mas ainda assim algumas desvantagens são enfrentadas, contudo esses inconvenientes podem ser resolvidos à medida que novas tecnologias são criadas (KIRAN *et al.*, 2016).

### **2.1.3 Conclusão**

As lipases são enzimas muito versáteis utilizadas em diversos setores industriais, sendo suas características bioquímicas e atividade amplamente influenciadas pela fonte de obtenção, formulação de meio de cultivo e método de fermentação. Novos microrganismos isolados de fontes residuais podem ser uma alternativa para minimizar os custos de produção, além propiciar a descoberta de novas lipases. A imobilização enzimática torna-se extremamente fundamental pois essa técnica permite melhorar as características da enzima principalmente a cerca de sua estabilidade, parâmetro importante requerido nos processos industriais, tornando desta maneira as lipases alvo de muitos segmentos devido suas características interessantes, podendo ter sua aplicação em vários campos como no setor alimentício e farmacêutico.

## 2.1.4 Referências

- AAMRI, L. *et al.* Arthrographis curvata and *Rhodospiridium babjevae* as new potential fungal lipase producers for biotechnological applications. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 63, p. 1-9, 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2020180444>.
- ADIO, O. L. *et al.* Production of lipases in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* F7-02 with agricultural residues. **Journal Of Microbiology, Biotechnology And Food Sciences**, v. 04, n. 06, p. 509-512, June. 2015. <http://dx.doi.org/10.15414/jmbfs.2015.4.6.509-512>.
- AGHAEI, H. *et al.* Efficient hydrolysis of starch by  $\alpha$ -amylase immobilized on cloisite 30b and modified forms of cloisite 30b by adsorption and covalent methods. **Food Chemistry**, v. 373, p. 131425, Mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131425>.
- AGUIAR, G. P. S. *et al.* Produção de lipase microbiana a partir de resíduos de corvina. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 10, n. 1, p. 118-129, 2018.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M.G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52-67, Nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2015.06.064>.
- ALAMI, N. H. *et al.* Lipase production in lipolytic yeast from *Wonorejo mangrove* area. **Aip Conference Proceedings** 1854, p. 020001-0200011, 2017. <http://dx.doi.org/10.1063/1.4985392>.
- ALIYAH, A. N. *et al.* Solid state fermentation using agroindustrial wastes to produce *Aspergillus niger* lipase as a biocatalyst immobilized by an adsorption-crosslinking method for biodiesel synthesis. **International Journal Of Technology**, v. 7, n. 8, p. 1392, Dec. 2016. <http://dx.doi.org/10.14716/ijtech.v7i8.6988>.
- AMARAL-FONSECA, M. *et al.* Preparation of magnetic cross-linked amyloglucosidase aggregates: solving some activity problems. **Catalysts**, v. 8, n. 11, p. 496-517, Oct. 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/catal8110496>.
- AMID, M. *et al.* A novel aqueous two phase system composed of surfactant and xylitol for the purification of lipase from pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds and recycling of phase components. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11184-11201, June. 2015. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules200611184>.
- AMINI, Z. *et al.* Biodiesel production by lipase-catalyzed transesterification of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) seed oil. **Energy Conversion And Management**, v. 132, p. 82-90, Jan. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2016.11.017>.
- ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6475-6490, 2013. <http://dx.doi.org/10.1039/c3cs35484a>.
- ASGHER, M.; BASHIR, F.; IQBAL, H. M. N. Protease-based cross-linked enzyme aggregates with improved catalytic stability, silver removal, and dehairing potentials. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1247-1256, Oct.

2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.107>

AVELAR M. H. M. *et al.* Hidrólise de óleos vegetais catalisada pelo extrato de lipase em pó de sementes dormentes de mamona. **Ind Crops Prod** 44: 452-458, 2013.

AVHAD, M. R.; MARCHETTI, J. M. Uses of enzymes for biodiesel production. In: **Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts**. Woodhead Publishing, p. 135-152, 2019.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Lipase immobilization on hydroxypropyl methyl cellulose support and its applications for chemo-selective synthesis of  $\beta$ -amino ester compounds. **Process Biochem**, v. 51, p. 1420–1433, 2016.

BALAJI, L.; CHITTOOR, J. T.; JAYARAMAN, G. Optimization of extracellular lipase production by halotolerant *Bacillus* sp. VITL8 using factorial design and applicability of enzyme in pretreatment of food industry effluents. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, n. 7, p. 708-716, Mar. 2020.

BALDUYCK, L. *et al.* Optimization of a Nile Red method for rapid lipid determination in autotrophic, marine microalgae is species dependent. **Journal Of Microbiological Methods**, v. 118, p. 152-158, Nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2015.09.009>.

BANCERZ, R. 2017. Przemysłowe zastosowania lipaz. **Postępy Biochemii**, v. 63, n. 4, p. 335-341, 2017.

BARÁNKOVÁ, E.; DOHNAL, V. Effect of additives on volatility of aroma compounds from dilute aqueous solutions. **Fluid Phase Equilibria**, v. 407, p. 217-223, Jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fluid.2015.05.038>.

BARBOZA, A. M. *et al.* A biosensor based on microbial lipase immobilized on lamellar zinc hydroxide-decorated gold nanoparticles for carbendazim determination. **Analytical Methods**, v. 11, n. 42, p. 5388-5397, 2019. <http://dx.doi.org/10.1039/c9ay01600g>.

BARRIUSO, J. *et al.* Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: a review. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 874-885, Sept. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.004>.

BAVANDI, H.; HABIBI, Z.; YOUSEFI, M. Porcine pancreas lipase as a green catalyst for synthesis of bis-4-hydroxy coumarins. **Bioorganic Chemistry**, v. 103, p. 1-5, Oct. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104139>.

BELI, C. M.; MAGESTE, J. M.; TAKETANI, N. F. Bioprospecção de enzimas para cosmética: seu impacto na biotecnologia. **Revista Ensaios Pioneiros**, v. 3, n. 2, p. 10-24, 2020.

BELLAOUCHI, R. *et al.* Characterization and optimization of extracellular enzymes production by *Aspergillus niger* strains isolated from date by-products. **Journal Of Genetic Engineering And Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 2-8, Mar. 2021. <http://dx.doi.org/10.1186/s43141-021-00145-y>.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G.; Microbial lipases: An overview of screening, production and purification, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p.101368, 2019.

BHARDWAJ, K. K.; GUPTA, R. Synthesis of chirally pure enantiomers by lipase. **Journal Of Oleo Science**, v. 66, n. 10, p. 1073-1084, 2017.

BHOSALE, H.; SHAHEEN, U.; KADAM, T. Characterization of a hyperthermostable alkaline lipase from *Bacillus sonorensis* 4R. **Enzyme Research**, v. 2016, p. 1-11, Jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4170684>.

BILAL, M. *et al.* State-of-the-art protein engineering approaches using biological macromolecules: a review from immobilization to implementation view point. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 893-901, Mar. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.182>

BOROWIECKI, P.; JUSTYNIAK, I.; OCHAL, Z. Lipase-catalyzed kinetic resolution approach toward enantiomerically enriched 1-( $\beta$ -hydroxypropyl) indoles. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 28, n. 12, p. 1717-1732, Dec. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetasy.2017.10.010>.

BORRELLI, G.; TRONO, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20774-20840, Sept. 2015. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms160920774>.

CAIRNS, T. C.; NAI, C.; MEYER, V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. **Fungal Biology And Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 2-14, May. 2018. <http://dx.doi.org/10.1186/s40694-018-0054-5>.

CAO, M. *et al.* Homogenization and lipase treatment of milk and resulting methyl ketone generation in blue cheese. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 62, n. 25, p. 5726-5733, Jan. 2014. <http://dx.doi.org/10.1021/jf4048786>.

CAO, S. L. *et al.* Preparation and characterization of immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia* onto magnetic cellulose nanocrystals. **Scientific Reports**, v. 6, p. 20420, Feb. 2016.

CARVALHO, A. C. L. M. *et al.* Recent advances in lipase-mediated preparation of pharmaceuticals and their intermediates. **International Journal Of Molecular Sciences**, p. 29682-29716, 2015.

CARVALHO, T. *et al.* Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 259-266, Feb. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.019>.

CASAS-GODOY, L. *et al.* Lipases: an overview. **Lipases And Phospholipases**, p. 3-38, 2018. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_1).

CASTIGLIONI, G. L.; COSTA, J. A. V.; ALEGRE, R. M. Estudo da produção de lipase por *Burkholderia cepacia*. **Eng. Sanit. Ambient.** Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 637-644, Aug. 2018.

CASTRO, F. F. *et al.* Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus westerdijkiae*. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 321-328, Apr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.04.009>.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melão e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 26, n. 2, p. 105-112, 2005.

CHANDRA, P. *et al.* Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 2-42, Aug. 2020. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>.

CHEN, C. C. *et al.* Two novel lipases purified from rice bran displaying lipolytic and esterification activities. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 298-306, Oct. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.026>.

CHOUDHURY, A. K. R. Enzyme applications in textile chemical processing. **Sustainable Technologies For Fashion And Textiles**, p. 91-115, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-102867-4.00005-0>.

COLLA, L. M. *et al.* Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-9, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/725959>.

COLLA, L. M. *et al.* Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 461-467, Apr. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.028>.

CONG, S. *et al.* *Aspergillus niger* lipase CutA having flavor ester synthesis activity. **Food And Fermentation Industries**, v. 45, n. 22, p. 1-5, 2019b.

CONG, S. *et al.* Synthesis of flavor esters by a novel lipase from *Aspergillus niger* in a soybean-solvent system. **3 Biotech**, v. 9, n. 6, p. 2-7, June. 2019a. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-019-1778-5>.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. Potential catalytic of myceliumbound lipase of filamentous fungi in biotransformation processes. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 85-96, 2017.

COSTA, M. J. *et al.* Enzymatic biodiesel production by hydroesterification using waste cooking oil as feedstock. **Chemical Engineering And Processing - Process Intensification**, v. 157, p. 108131, Nov. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2020.108131>.

COSTA, T. M. *et al.* Lipase production by *Aspergillus niger* grown in different agro-industrial wastes by solid-state fermentation. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 419-427, Apr. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170342s20150477>.

CUI, J. D. *et al.* Preparation of spherical cross-linked lipase aggregates with improved activity, stability and reusability characteristic in water-in-ionic liquid

microemulsion. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, n. 7, p. 1785-1793, Jan. 2017. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.5179>.

CUI, J. D.; LIU, R. L.; LI, L. B. A facile technique to prepare cross-linked enzyme aggregates of bovine pancreatic lipase using bovine serum albumin as an additive. **Korean Journal Of Chemical Engineering**, v. 33, n. 2, p. 610-615, Jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s11814-015-0190-z>.

CUJILEMA-QUITIO, M. C. *et al.* Producción de lipasas por fermentación sólida con *aspergillus niger*: influencia del pH. **Cen. Az.**, Santa Clara, v. 45, n. 4, p. 1-9, Dic. 2018.

DANIAL, E. N.; MAHA, I. A. Co-Immobilisation of superoxide dismutase and catalase using an in vitro encapsulation protocol. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 4, p. 2489–94, June. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.04.003>.

DARWISH, S. S. *et al.* Evaluation of effectiveness of covalently immobilized  $\alpha$ - amylase and lipase in cleaning of historical textiles. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 9952 – 9962, 2020.

DIAS, R. F.; CARVALHO FILHO, C. A. A. Bioeconomiano Brasil e no mundo: panorama atual e perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 410–430, 2017.

DOBREV, G. *et al.* Lipase biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* in a nutrient medium containing products and byproducts from the oleochemical industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 77-82, 2015.

DONG, H. *et al.* Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite. **Chemical Engineering Journal**, v. 181-182, p. 590-596, Feb. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2011.11.095>.

DORAISWAMY, N.; SARATHI, M.; PENNATHUR, G. Cross-linked esterase aggregates (CLEAs) using nanoparticles as immobilization matrix. **Preparative Biochemistry And Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 270-278, Feb. 2019. <http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2018.1536993>

ELEGADO, F. *et al.* Screening, identification and optimization of extracellular lipase production of yeast (*Cryptococcus flavescens*) isolated from a tree canopy fern in the Mount Makiling Forest Reserve, Philippines. **Proceedings Of The 2Nd International Conference On Biosciences And Medical Engineering (Icbme2019)**: p. 0200291-02002911, 2019. <http://dx.doi.org/10.1063/1.5125533>.

EL-SHEMY, N. S.; EL-HAWARY, N. S.; EL-SAYED, H. Basic and reactive-dyeable polyester fabrics using lipase enzymes. **Journal Of Chemical Engineering & Process Technology**, v. 07, n. 01, p. 1-5, 2015. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7048.1000271>.

ENZYMES MARKET SIZE, 2021. Share & Trends Analysis Report by Application (Industrial enzymes, specialty enzymes), by product (carbohydrase, proteases, lipases), by Source, By Region, And Segment Forecasts, 2020 – 2027. <http://https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry> (accessed 11 January 2021).

ES, I.; VIEIRA, J. S. D.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2065-2082, Jan. 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6390-y>.

FACCHINI, F. D. A. *et al.* Enhanced lipase production of *Fusarium verticillioides* by using response surface methodology and wastewater pretreatment application. **Journal Of Biochemical Technology**, v. 6, n. 3, p. 996-1002, 2015.

FAN, Y. *et al.* Carbon nanotube filled with magnetic iron oxide and modified with polyamidoamine dendrimers for immobilizing lipase toward application in biodiesel production. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, Mar. 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/srep45643>

FATIMA, S. *et al.* Harmful effect of detergents on lipase. **Cell Biochemistry And Biophysics**, v. 70, n. 2, p. 759-763, May. 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-014-9978-4>.

FERRAZ, J. L. A. A.; SOUZA, L.O.; SILVA, T. P.; FRANCO, M. Obtaining of microbial lipase: a brief review. **Recen**, v. 20, p. 30-53, 2018. <https://doi.org/10.5935/RECEN.2018.01.03>.

FERREIRA G. G. R. *et al.* Immobilization of porcine pancreatic lipase on activated carbon by adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. **Process Biochemistry**, v. 111, p. 114–23, Dec. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.10.027>.

FICARRA, F. A. *et al.* Genome mining of lipolytic exoenzymes from *Bacillus safensis* S9 and *Pseudomonas alcaliphila* ED1 isolated from a dairy wastewater lagoon. **Archives Of Microbiology**, v. 198, n. 9, p. 893-904, June. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-016-1250-4>

FOTOUH, D. M. A.; BAYOUMI, R. A.; HASSAN, M. A. Production of thermoalkaliphilic lipase from *Geobacillus thermoleovorans* 2 and application in leather industry. **Enzyme Research**, v. 2016, p. 1-9, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9034364>.

FROTA, E. G. *et al.* Co-immobilization of amylases in porous crosslinked gelatin matrices by different reticulations approaches. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 1002–1009, Dec. 2020, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.220>.

GAO, Z. *et al.* Lipase immobilization on functionalized mesoporous TiO<sub>2</sub>: specific adsorption, hyperactivation and application in cinnamyl acetate synthesis. **Process Biochemistry**, v. 64, p. 152-159, Jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.011>.

GARCÍA-SILVERA, E. E. *et al.* Production and application of a thermostable lipase from *Serratia marcescens* in detergent formulation and biodiesel production. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 65, n. 2, p. 156-172, 2018.

GARRIDO, J. V. M. L.; SILVA, C. F. Prospecção tecnológica e científica da utilização de lipases microbianas para tratamento de efluentes. **Cad. Prospec**, Salvador, v. 9, n. 3, p. 298-306, 2016.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. 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, n. 2, p. 327-334, Dec. 2018b. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.04.003>,

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 241-253, Apr. 2018a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.009>.

GOETZE, D. *et al.* Effect of feather meal as proteic feeder on combi-cleas preparation for grape juice clarification. **Process Biochemistry**, v. 62, p. 122–127. Nov. 2017, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.015>.

GOLUNSKI, S. M. *et al.* Ultrasound effects on the activity of *Aspergillus niger* lipases in their application in dairy wastewater treatment. **Environmental Quality Management**, v. 27, n. 1, p. 95-101, Dec. 2017. <http://dx.doi.org/10.1002/tqem.21508>.

GONÇALVES FILHO, D.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7399-7423, Aug. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6>.

GOTTSCHALK, L. M. F. *et al.* Produção eficiente das enzimas lignocelulolíticas xilanase,  $\beta$ -xilosidase, esterase de ácido ferúlico e  $\beta$ -glucosidase pela cepa mutante *Aspergillus awamori* 2B.361 U2 / 1. **Jornal Brasileiro de Microbiologia**, v. 44, p. 569-576, 2013.

GRICAJEVA, A.; BENDIKIENÈ, V.; KALÈDIENÈ, L. Lipase of *Bacillus stratosphericus* L1: cloning, expression and characterization. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 96-104, Nov. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.015>.

GUAJARDO, N. *et al.* Immobilized lipase-clea aggregates encapsulated in lentikats® as robust biocatalysts for continuous processes in deep eutectic solvents. **Journal of Biotechnology**, v. 310, p. 97–102, Feb. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.02.003>.

GUAN, C. *et al.* Isolation of novel *Lactobacillus* with lipolytic activity from the vinasse and their preliminary potential using as probiotics. **Amb Express**, v. 10, n. 1, May. 2020. <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-020-01026-2>.

GUERRAND, D. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. **Ocl**, v. 24, n. 4, p. 1-7, June. 2017. <http://dx.doi.org/10.1051/ocl/2017031>

GULDHE, A. *et al.* Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized *Aspergillus niger* whole cell lipase biocatalyst. **Renewable Energy**, v. 85, p. 1002-1010, Jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2015.07.059>.

GUPTA, R. *et al.* Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress In Lipid Research**, v. 57, p. 40-54, Jan. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2014.12.001>.

GUTIÉRREZ-ARNILLAS, E. *et al.* New sources of halophilic lipases: isolation of bacteria from spanish and turkish saltworks. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 170-177, May. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.015>.

HAQ, A. *et al.* Screening of lipase-producing bacteria and optimization of lipase-mediated biodiesel production from *Jatropha curcas* seed oil using whole cell Approach. **Bioenergy Research**, v. 13, n. 4, p. 1280-1296, June. 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-020-10156-1>.

HASANAHI, U. *et al.* Construction of a hydrogel pectin-based triglyceride optical biosensor with immobilized lipase enzymes. **Biosensors**, v. 9, n. 4, p. 1-11, Nov. 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/bios9040135>.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases, **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, p. 235–251. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>

HASAN, N.A. *et al.* Identification and optimization of lipase producing bacteria from palm oil contaminated waste. **Journal Of Fundamental And Applied Sciences**, v. 10, n. 2, p. 300-310, 2018.

HASSAN, S. W. M. *et al.* Production of cold-active lipase by free and immobilized marine *Bacillus cereus* hss: application in wastewater treatment. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, p. 1-21, 23 out. 2018. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.02377>.

HERMANSYAH, H.; ANDIKOPUTRO, M. I.; ALATAS, A. Production of lipase enzyme from *Rhizopus oryzae* by solid state fermentation and submerged fermentation using wheat bran as substrate. **Aip Conference Proceedings 2085**, p. 0200131-0200136, 2019. <http://dx.doi.org/10.1063/1.5094991>.

HILLS, G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. **European Journal Of Lipid Science And Technology**, v. 105, n. 10, p. 601-607, Oct. 2003. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200300853>.

HOMAEI, A. Enzyme immobilization and its application in the food industry. **Advances In Food Biotechnology**, p. 145-164, Oct. 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/9781118864463.ch09>.

HONG, J. *et al.* Immobilization of laccase via cross-linked enzyme aggregates prepared using genipin as a natural cross-linker. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 541-550, Feb. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.136>.

HORMOZI, J. S. R. *et al.* High throughput covalent immobilization process for improvement of shelf-life, operational cycles, relative activity in organic media and enzymatic kinetics of urease and its application for urea removal from water samples. **Process Biochemistry**, v. 90, p. 102–112. Mar. 2020, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.001>.

HU, J. *et al.* Purification and characterization of alkaline lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* HFE733 and application for biodegradation in food wastewater treatment. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 32, n. 3, p. 583-590, May. 2018. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2018.1446764>.

- HUANG, W. C.; CHEN, C. Y.; WU, S. J. Almond skin polyphenol extract inhibits inflammation and promotes lipolysis in differentiated 3T3-L1 adipocytes. **Journal Of Medicinal Food**, v. 20, n. 2, p. 103-109, Feb. 2017. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2016.3806>.
- IULIANO, M. *et al.* *Candida rugosa* lipase for the biodiesel production from renewable sources. **Renewable Energy**, v. 162, p. 124-133, Dec. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2020.08.019>.
- JAVED, S. *et al.* Bacterial lipases: a review on purification and characterization. **Progress In Biophysics And Molecular Biology**, v. 132, p. 23-34, Jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>.
- JESUS, M. V. *et al.* Produção de lipase utilizando manipueira como fonte alternativa de carbono. **Scientia Plena**, v. 12, n. 5, p. 1-7, 2016. <http://dx.doi.org/10.14808/sci.plena.2016.054208>.
- KALANTZI, S. *et al.* Improved properties of cotton fabrics treated with lipase and its combination with pectinase. **Fibres & textiles in Eastern Europe**, v. 82, n. 5, p. 86-92, 2010.
- KAZLAUSKAS, R. Hydrolysis and formation of carboxylic acid and alcohol derivatives. **Organic Synthesis Using Biocatalysis**, p. 127-148, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-411518-7.00005-6>.
- KHAN, F. I. *et al.* The Lid Domain in Lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, v. 5, p. 1-13, Mar. 2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016>
- KHAN, M. T. *et al.* Characterization and synthetic biology of lipase from *Bacillus amyloliquefaciens* strain. **Archives Of Microbiology**, v. 202, n. 6, p. 1497-1506, Mar. 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-020-01869-0>
- KIRAN, S. *et al.* Microbial lipases: production and applications: a review. **Journal Of Biochemistry, Biotechnology And Biomaterials**, v. 2, n. 1, p. 7-20, 2016.
- KISHAN, G. *et al.* Statistical optimization of critical medium components for lipase production from *Yarrowia lipolytica* (MTCC 35). **Journal Of Genetic Engineering And Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 111-116, Dec. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2013.06.001>.
- KOUTEU, P. A. N. *et al.* Lipase activity of tropical oilseed plants for ethyl biodiesel synthesis and their typto- and regioselectivity. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 64, n. 46, p. 8838-8847, Nov. 2016. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03674>
- KUEPETHKAEW, S. *et al.* Laundry detergent-stable lipase from pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas: effect of extraction media and biochemical characterization. **International Journal Of Food Properties**, v. 20, n. 4, p. 769-781, May. 2016. <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2016.1180534>.
- KUMAR, A. *et al.* Lipase catalysis in organic solvents: advantages and

applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 1-11, Jan. 2016.  
<http://dx.doi.org/10.1186/s12575-016-0033-2>.

KUMAR, A. *et al.* Microbial lipolytic enzymes – promising energy-efficient biocatalysts in bioremediation. **Energy**, v. 192, p. 1-37, Feb. 2020.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2019.116674>.

KUMAR, J. A.; KUMAR, M. S. A study on improving dyeability of polyester fabric using lipase enzyme. **Autex Research Journal**, v. 20, n. 3, p. 243-249, Sept. 2020.  
<http://dx.doi.org/10.2478/aut-2019-0030>.

KUMAR, K. *et al.* Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. **Bioresources And Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 1-14, Apr. 2017a.  
<http://dx.doi.org/10.1186/s40643-017-0148-6>.

KUMAR, S. *et al.* Improved enzyme properties upon glutaraldehyde cross-linking of alginate entrapped xylanase from *Bacillus licheniformis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 24–33, May. 2017b,  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.104>.

KUNCHAROEN, N. *et al.* Identification and lipolytic activity of yeasts isolated from foods and wastes. **Mycology**, p. 1-8, Mar. 2020. <http://dx.doi.org/10.1080/21501203.2020.1745922>.

KTATA, A. *et al.* Purification, biochemical and molecular study of lipase producing from a newly thermoalkaliphilic *Aeribacillus pallidus* for oily wastewater treatment. **The Journal Of Biochemistry**, v. 167, n. 1, p. 89-99, Oct. 2019. <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvz083>.

LALL, W. S.; SIROHI, R.; PRAKASH, V. Otimização do processo para a produção de lipase por fermentação em estado sólido. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 10, p. 703-712, 2014.

LAN, D. *et al.* Enhancing production of lipase MAS1 from marine *Streptomyces* sp. strain in *Pichia pastoris* by chaperones co-expression. **Electronic Journal Of Biotechnology**, v. 22, p. 62-67, July 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.06.003>.

LARIK, I. A. *et al.* *Stenotrophomonas maltophilia* strain 5DMD: an efficient biosurfactant-producing bacterium for biodegradation of diesel oil and used engine oil. **International Journal Of Environmental Science And Technology**, v. 16, n. 1, p. 259-268, Mar. 2018.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s13762-018-1666-2>.

LATIP, W. *et al.* Expression and characterization of thermotolerant lipase with broad pH profiles isolated from an Antarctic *Pseudomonas* sp strain AMS3. **PeerJ**, v. 4, p. e2420, 2016.  
<http://dx.doi.org/10.7717/peerj.2420>.

LIMA, L. G. R. *et al.* Lipase production by *Aspergillus niger* C by submerged Fermentation. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 62, p. 1-14, 2019.  
<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2019180113>.

LIMA, R. T. *et al.* Mycelium-bound lipase from *Penicillium citrinum* as biocatalyst for the hydrolysis of vegetable oils. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101410,

2019b. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101410>.

LIMA, V. O.; PRATES, K. V. M. C.; FAZOLO, A. Avaliação da eficiência de bactérias lipásicas e lipase suína no pré-tratamento de efluente de curtume. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 8, n. 4, p. 131-151, Jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.19177/rgsa.v8e42019131-151>

LIU, W.; LI, M.; YAN, Y. Heterologous expression and characterization of a new lipase from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and used for biodiesel production. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, Jan. 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-16036-7>.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial enzymes of use in industry. **Biotechnology Of Microbial Enzymes**, p. 267-298, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-803725-6.00011-x>.

LI, Y. *et al.* Screening, purification, and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* isolated from stuffed buns steamers. **Journal Of Zhejiang University-Science B**, v. 20, n. 4, p. 332-342, Apr. 2019. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.b1800213>.

LOUHASAKUL, Y.; CHEIRSILP, B.; PRASERTSAN, P. Valorization of palm oil mill effluent into lipid and cell-bound lipase by marine yeast *Yarrowia lipolytica* and their application in biodiesel production. **Waste And Biomass Valorization**, v. 7, n. 3, p. 417-426, Nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-015-9451-7>.

LUAN, B.; ZHOU, R. A novel self-activation mechanism of *Candida antarctica* lipase B. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, n. 24, p. 15709-15714, 2017. <http://dx.doi.org/10.1039/c7cp02198d>.

MAFRA, A. C. O. *et al.* Diffusion effects of bovine serum albumin on cross-linked aggregates of catalase. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 107-116, Nov. 2016.

MALDONADO, R. R. A review on *Geotrichum* Lipases: production, purification, immobilization and applications. **Chemical And Biochemical Engineering Quarterly Journal**, v. 30, n. 4, p. 439-454, Jan. 2017. <http://dx.doi.org/10.15255/cabeq.2016.907>.

MAHALE, P. K. *et al.* Isolation, screening and characterization of lipase producing strain from oil contaminated soil of Hubballi, Karnataka. **Int J Basic and Appl Biol**, v. 2, n. 4, p. 198-201, 2015.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnología**. Segunda Edição, atualizada. Rio de Janeiro, 2016.

MARTINEZ-CORONA, R. *et al.* Avocado oil as an inducer of the extracellular lipase activity of *Kluyveromyces marxianus* L-2029. **Food Sci. Technol**, Campinas, v. 40, p. 121-129, June. 2020. <https://doi.org/10.1590/fst.06519>.

MARTÍNEZ-RUIZ, A. *et al.* Continuous ethyl oleate synthesis by lipases produced by solid-state fermentation by *Rhizopus microsporus*. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 52-58, Oct. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.080>.

MARTIN, L. S. *et al.* Different organic components on silica hybrid matrices modulate the

lipase inhibition by the glycerol formed in continuous transesterification reactions. **Journal Of Industrial And Engineering Chemistry**, v. 62, p. 462-470, June. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2018.01.029>.

MELIS, S. *et al.* Lipases as processing aids in the separation of wheat flour into gluten and starch: impact on the lipid population, gluten agglomeration, and yield. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 65, n. 9, p. 1932-1940, Feb. 2017. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04955>.

MEMARPOOR-YAZDI, M.; KARBALAEI-HEIDARI, H. R.; DOROODMAND, M. M. Enantioselective hydrolysis of ibuprofen ethyl ester by a thermophilic immobilized lipase, ELT, from *Rhodothermus marinus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 130, p. 55-65, Feb. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2017.11.016>.

MEMARPOOR-YAZDI, M.; KARBALAEI-HEIDARI, H. R.; KHAJEH, K. Production of the renewable extremophile lipase: valuable biocatalyst with potential usage in food industry. **Food And Bioproducts Processing**, v. 102, p. 153-166, Mar. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.12.015>.

MENDES, A. A. *et al.* Anaerobic biodegradability of dairy wastewater pretreated with porcine pancreas lipase. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 53, n. 6, p. 1279-1284, Dec. 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132010000600003>.

MICROBIAL LIPASES MARKET WORTH 590.2 MILLION USD BY 2023, (2018). <https://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/microbial-lipase.asp> (accessed October 07, 2020).

MONTEIRO, R. R.C. *et al.* Biotechnological relevance of the lipase a from *Candida antarctica*. **Catalysis Today**, v. 362, p. 141-154, Feb. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.026>.

MORAIS, W. G. *et al.* 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, July 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2016.04.001>.

MOREAU, R. A. *et al.* A comparison of the levels of oil, carotenoids, and lipolytic enzyme activities in modern lines and hybrids of grain sorghum. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 4, p. 569-573, Feb. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-016-2799-4>.

MOUNGUENGUI, R. W. M. *et al.* As lipases vegetais são uma alternativa promissora para catalisar a transesterificação para a produção de biodiesel? **Prog Energy Combust Sci**, v. 39, n. 5, p. 441-456, 2013.

MUKHTAR, H. *et al.* Studies on the lipase production by *Aspergillus niger* through solid state fermentation. **Pakistan Journal Of Botany**, v. 47, p. 351-354, 2015.

MULEY, A. B. *et al.* Preparation of cross-linked enzyme aggregates of lipase from *Aspergillus niger*: process optimization, characterization, stability, and application for

epoxidation of lemongrass oil. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, v. 44, n. 7, p. 1383-1404, Mar. 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-021-02509-7>.

NAVVABI, A. *et al.* Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. **Process Biochemistry**, v. 70, p. 61-70, July 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2018.04.018>.

NEETHU, C. S. *et al.* Utilization of agro-industrial wastes for the production of lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Arctic and optimization of physical parameters. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 703-709, Oct. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.002>.

NEGI, S. Lipases: a promising tool for food industry. **Energy, Environment, And Sustainability**, p. 181-198, Nov. 2018. [http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0\\_10](http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_10).

NEMA, A. *et al.* Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. **Bulletin Of The National Research Centre**, v. 43, n. 1, p. 2-8, May. 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s42269-019-0125-7>.

NGUYEN, H. H. *et al.* Immobilized enzymes in biosensor applications. **Materials**, v. 12, n. 1, p. 1-34, Jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/ma12010121>

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Microbial detergent compatible lipases. **Journal Of Scientific And Industrial Research**, v. 74, n. 2, p. 105-113, 2015.

OGUNNUSI, T. A.; OLORUNFEMI, O. Isolation and identification of proteolytic and lipolytic bacteria in cow dung and abattoir effluent from ekiti general abattoir, Ekiti State, Nigeria. **Journal Of Advances In Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 1-10, Sept. 2018. <http://dx.doi.org/10.9734/jamb/2018/42508>.

OKINO-DELGADO, C. H.; FLEURI, L. F. Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. **Food Chemistry**, v. 163, p. 103-107, Nov. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.090>.

PADILLA, C. J. P.; TABAREZ, M. R.; ORDUZ, S. Actividad lipolitica de microorganismos aislados de aguas residuales contaminadas con grasas. **Biotechnology En El Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 15, n. 1, p.36-44, 2017. [http://dx.doi.org/10.18684/bsaa\(15\)36-44](http://dx.doi.org/10.18684/bsaa(15)36-44)

PADMA, P, R; VASUDEVAN, N. Isolation and molecular characterization of proteolytic and lipolytic bacterial isolates from the market vegetable wastes. **International Journal Of Science Inventions Today**, v. 7, n. 1, p. 040-053, 2018.

PASHA, M. K. *et al.* Biodiesel production with enzymatic technology: progress and perspectives. **Biofuels, Bioproducts And Biorefining**, v. 15, n. 5, p. 1526–1548, May. 2021. <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.2236>.

PASCOAL, A. *et al.* Review: novel sources and functions of microbial lipases and their role in the infection mechanisms. **Physiological And Molecular Plant Pathology**, v. 104, p. 119-126, Dec. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.08.003>.

PATEL, H. *et al.* Enhanced lipase production from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* UKHL1 and its application in oily waste-water treatment. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 28, p. 101731, Sept. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101731>.

PATNALA, H.S. *et al.* Marine fungal and bacterial isolates for lipase production. **Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications, Part I - Production of Enzymes**, p. 71-94, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.06.001>

PEIL, G. H. S. *et al.* Bioprospecting of lipolytic microorganisms obtained from industrial effluents. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 3, p. 1769-1779, Aug. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201620150550>.

PENHA, E. M. *et al.* Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus Níger*. **Ciência Rural**, v. 46, n. 4, p. 755-761, Dec. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131673>.

PEREIRA, A. S. *et al.* Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst. **Food And Bioproducts Processing**, v. 115, p. 68-77, May. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2019.02.002>.

PÉREZ, M. M. *et al.* Fungal lipases: versatile tools for white biotechnology. **Recent Advancement In White Biotechnology Through Fungi**, p. 361-404, 2019. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1\\_11](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_11).

PHUKON, L. C. *et al.* Production and characterisation of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6. **Bioresource Technology**, v. 309, p. 1-8, Aug. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123352>.

PICÓ, E. A. *et al.* Easy reuse of magnetic cross-linked enzyme aggregates of lipase B from *Candida antarctica* to obtain biodiesel from *Chlorella vulgaris* lipids. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, v. 126, n. 4, p. 451-457, Oct. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.04.009>.

PISCITELLI, A. *et al.* New lipases by mining of *Pleurotus ostreatus* genome. **Plos One**, S.I, v. 12, n. 9, p. 1-15, 2017.

PODREPLEK, G. H.; KNEZ, Ž.; LEITGEB, M. Activation of cellulase cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) in scCO<sub>2</sub>. **The Journal Of Supercritical Fluids**, v. 154, p. 104629, Dec. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104629>.

PRABANINGTYAS, R. K. *et al.* Production of immobilized extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method using palm kernel cake, soybean meal, and coir pith as the substrate. **Energy Procedia**, v. 153, p. 242-247, Oct. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.010>.

PRIYANKA, P. *et al.* Isolation, purification and characterization of a novel solvent stable lipase from *Pseudomonas reinekei*. **Protein Expression And Purification**, v. 153, p. 121-130, Jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2018.08.007>.

PUTRI, D. N. *et al.* Optimization of *Aspergillus niger* lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. **Energy Reports**, v. 6, p. 331-335, Feb. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.egy.2019.08.064>.

QIAN, J. *et al.* Preparation of nano-enzyme aggregates by crosslinking lipase with sodium tripolyphosphate. **Process Biochemistry**, v. 97, p. 19-26, Oct. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.026>.

QUEIROZ, M. *et al.* Imobilização de peroxidase de raiz forte em bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 41, n. 9, p. 1019–1024, 2018.

RAHMAN, I. A. *et al.* Formulation and evaluation of an automatic dishwashing detergent containing t1 lipase. **Journal Of Surfactants And Detergents**, v. 16, n. 3, p. 427-434, 12 Oct. 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s11743-012-1398-0>

RAY, A. Application of lipase in industry. **Asian J. Pharm. Technol.** v. 2, n. 2, p. 33-37, 2012.

REINEHR, C. O. *et al.* Lipases production with hydrolytic activity by *Aspergillus using* agroindustrial byproducts, soy oil and glycerol. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 1, p. 97-115, 2016.

REIS, R. L. S *et al.* Evaluation of biotechnological potential of *Aspergillus parasiticus* ucp 1281 in the wastewater biotreatment of dairy industry and lipids production. **E-xacta**, v. 8, n. 1, p. 31-42, 2015.

RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R.; FRANÇA, L. R. **Biotecnologia aplicada à agro & indústria: Fundamentos e Aplicações**. 4. ed. São Paulo: Blucher, 2016. 1069 p.

RIOS, N. S. *et al.* Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 99-120, Dec. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2018.09.003>.

RODRIGUES, C. *et al.* Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases com base na atividade lipásica e no potencial hidrolítico sobre óleo comestível de soja e espuma de caixa de gordura. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 507-518, Jul. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-41522016141401>.

RODRIGUES, M. L. F. *et al.* Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado das folhas de *Ricinus communis* L. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, p. 129-145, 2015.

ROJAS, M. *et al.* Preparation of crosslinked enzyme aggregates of a thermostable cyclodextrin glucosyltransferase from *Thermoanaerobacter* Sp. critical effect of the crosslinking agent. **Catalysts**, v. 9, n. 2, p. 120, Jan. 2019, <https://doi.org/10.3390/catal9020120>.

ROMANO, I. *et al.* Avaliação da biomassa de fungos amazônicos como fonte de lipases para biocatálise. **Química Nova**, p. 146-154, 2020. <http://dx.doi.org/10.21577/0100->

[4042.20170470](https://doi.org/10.1080/104420170470).

RUEDA-LÓPEZ, S.; MARTÍNEZ-MONTAÑO, E.; VIANA, M. T. Biochemical characterization and comparison of pancreatic lipases from the pacific bluefin tuna, *thunnus orientalis*; *Totoaba*, *Totoaba macdonaldi*; and *Striped bass*, *Morone saxatilis*. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 48, n. 1, p. 156-165, Sept. 2016.

SAE-LEAW, T.; BENJAKUL, S. Lipase from liver of seabass (*Lates calcarifer*): characteristics and the use for defatting of fish skin. **Sootawat Benjakul**, p. 9-15, 2018.

SAHOO, R. K; SAHU, A.; SUBUDHI, E. Bioremediation of hydrocarbon using bacterial lipase from waste biomass. **Iranian Journal Of Science And Technology, Transactions A: Science**, v. 44, n. 5, p. 1287-1293, July 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s40995-020-00935-y>.

SALES, P. S. C. *et al.*, Production of lipase by *Cunninghamella echinulata* UCP 1308 in through submerged fermentation in different culture media. **Engevista**, v. 19, n.5, p. 1340-1351, 2017. <https://doi.org/10.22409/engevista.v19i5.973>.

SALGADO, V. *et al.* Isolation and Identification of *magnusiomyces capitatus* as a lipase-producing yeast from olive mill wastewater. **Waste And Biomass Valorization**, v. 11, n. 7, p. 3207-3221, June. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-019-00725-7>.

SALIHU, A.; BALA, M.; ALAM, MD, Z. Lipase production by *Aspergillus niger* using sheanut cake: an optimization study. **Journal Of Taibah University For Science**, v. 10, n. 6, p. 850-859, Oct. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.02.011>.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z. Solvent tolerant lipases: A review (2015). **Process Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 86-96, 2017.

SALWOOM, L. *et al.* Isolation, characterisation, and lipase production of a cold-adapted bacterial strain *Pseudomonas* sp. LSK25 isolated from Signy Island, Antarctica. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 1-14, 2019.

SAMOYLOVA, Y. *et al.* Preparation of stable cross-linked enzyme aggregates (cleas) of a *Ureibacillus thermosphaericus* esterase for application in malathion removal from wastewater. **Catalysts**, v. 8, n. 4, p. 154-173, Apr. 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/catal8040154>.

SANDOVAL, G. *et al.* Enzyme-catalyzed production of biodiesel as alternative to chemical catalyzed processes: advantages and constraints. **Current Biochemical Engineering**, v. 4, n. 2, p. 109-141, 2017.

SANFILIPPO, C.; NICOLOSI, G.; PATTI, A. Milnacipran as a challenging example of aminomethyl substrate for lipase-catalyzed kinetic resolution. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 104, p. 82-86, June. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.03.015>.

SANKARAN, R.; SHOW, P. L.; CHANG, J. S. Biodiesel production using immobilized lipase: feasibility and challenges. **Biofuels, Bioprod. Bioref**, v. 10, n. 6, p. 896-916, 2016. DOI: 10.1002/bbb.

SANTOS, E. A. L. *et al.* Lipase from *Aspergillus niger* obtained from mangaba residue fermentation: biochemical characterization of free and immobilized enzymes on a sol-gel matrix. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, n. 1, p. 1-8, Feb. 2017. <http://dx.doi.org/10.4025/actascitechnol.v39i1.29887>.

SANTOS, R. C. F. *et al.* Microbial lipase obtained from the fermentation of pumpkin seeds: immobilization potential of hydrophobic matrices. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 36, n. 2, p. 193-201, Apr. 2014. <http://dx.doi.org/10.4025/actascitechnol.v36i2.18275>

SARASWAT, R. *et al.* Evaluation of alkali and thermotolerant lipase from an indigenous isolated Bacillus strain for detergent formulation. **Electronic Journal Of Biotechnology**, v. 30, p. 33-38, Nov. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.08.007>.

SARASWAT, R. *et al.* Production and purification of an alkaline lipase from Bacillus sp. for enantioselective resolution of ( $\pm$ ) -Ketoprofen butyl ester. **3 Biotech**, v. 8, n. 12, p. 1-12, 19 Nov. 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-018-1506-6>.

SARMAH, N. *et al.* Recent advances on sources and industrial applications of lipases. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 1, p. 5-28, Dec. 2017. <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.2581>.

SARNO, M.; IULIANO, M.; POLICHETTI, M.; CIAMBELLI, P. High activity and selectivity immobilized lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for banana flavour synthesis, **Process Biochemistry**. 2017.

SATTI, S. M. *et al.* Statistical optimization of lipase production from *Sphingobacterium* sp. strain S2 and evaluation of enzymatic depolymerization of Poly(lactic acid) at mesophilic temperature. **Polymer Degradation And Stability**, v. 160, p. 1-13, Feb. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.11.030>.

SAWANT, G. *et al.* In silico approach towards lipase mediated chemoenzymatic synthesis of (S)-ranolazine, as an anti-anginal drug. **Rsc Advances**, v. 6, n. 54, p. 49150-49157, 2016. <http://dx.doi.org/10.1039/c6ra06879k>.

SCHAFFARCZYK, M.; ØSTDAL, H.; KOEHLER, P. Lipases in wheat breadmaking: analysis and functional effects of lipid reaction products. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 62, n. 32, p. 8229-8237, July 2014. <http://dx.doi.org/10.1021/jf5022434>.

SETHI, B. K.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 143-149, Jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.026>.

SETH, S. *et al.* An insight into plant lipase research – challenges encountered. **Protein Expression and Purification**, v. 95, p. 13-21, Mar. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2013.11.006>.

SHALINI, P. *et al.* Synthesis and characterisation of lipase immobilised magnetic nanoparticles and its role as a catalyst in biodiesel production. **Materials Today: Proceedings**, July 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2021.07.027>.

SHARMA, A. K.; SHARMA, V.; SAXENA, J. A review on applications of microbial lipases. **International Journal Of Biotech Trends And Technology**, v. 19, n. 1, p. 1-5, Nov. 2016. <http://dx.doi.org/10.14445/22490183/ijbtt-v19p601>.

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic solvent tolerant lipases and applications. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-15, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/625258>.

SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 1, p. 213-223, 2011.

SIDENEY, B. O. *et al.* Selection of filamentous fungi producing lipases from residual waters of slaughterhouses. **African Journal Of Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 247-253, Feb. 2017. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb2016.15629>.

SIKORA, A. *et al.* Enantioseparation of (RS)-atenolol with the use of lipases immobilized onto new-synthesized magnetic nanoparticles. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 28, n. 2, p. 374-380, Feb. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetasy.2017.01.012>.

SILVA, F. A.; KOPP, W.; GIORDANO, R. L. C. Extração de lipase de mamona (*Ricinus communis L.*) em fase aquosa. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, p. 1754-1761, fev. 2015. <http://dx.doi.org/10.5151/chemeng-cobeq2014-1216-20459-174947>.

SINGH, R. *et al.* Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, Aug. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>.

SINGH, T. A. *et al.* Optimization of various encapsulation systems for efficient immobilization of actinobacterial glucose isomerase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 29, p. 101766, Oct. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101766>.

SIRISHA, V. L.; ANKITA JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme Immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. **Advances in Food and Nutrition Research**. v.79, p.179–211, 2016.

SOARES, J. L. *et al.* Reduction of scum accumulation through the addition of low-cost enzymatic extract in the feeding of high-rate anaerobic reactor. **Water Science And Technology**, v. 80, n. 1, p. 67-74, July 2019. <http://dx.doi.org/10.2166/wst.2019.247>.

SOARES, M. K. G. *et al.* Assessment of lipolytic activity of isolated microorganisms from the savannah of the Tocantins. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 4, p. 471-475, Oct. 2015. <http://dx.doi.org/10.4025/actascibiols.v37i4.24324>.

SOLEYMANI, S. *et al.* Efficient media for high lipase production: one variable at a time approach. **Avicenna Journal Of Medical Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 82-86, 2017.

SONAWANE, A.; MANICKAM, P.; BHANSALI, S. Stability of enzymatic biosensors for wearable applications. **IEEE Reviews In Biomedical Engineering**, v. 10, p. 174-186, 2017. <http://dx.doi.org/10.1109/rbme.2017.2706661>.

SOUZA, C. E. C.; RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z. Characterization and application of

yarrowia lipolytica lipase obtained by solid-state fermentation in the synthesis of different esters used in the food industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 3, p. 933-959, June. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-019-03047-5>.

SOUZA, L. T. A. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biotecnologia Aplicada À Agro&Indústria**, v. 4, p. 529-568, Jan. 2017. <http://dx.doi.org/10.5151/9788521211150-15>.

SPERB, J. G. C. *et al.* Avaliação qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. **Engevista**, v. 17, n. 3, p. 385-397, 2015.

STAUCH, B.; FISHER, S. J.; CIANCI, M. Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. **Journal Of Lipid Research**, v. 56, n. 12, p. 2348-2358, Oct. 2015. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.m063388>.

SUYANTO, E; SOETARTO, E. S.; CAHYANTO, M N. Production and optimization of lipase by *Aspergillus niger* using coconut pulp waste in solid state fermentation. **Journal Of Physics: Conference Series**, v. 1374, p. 1-6, Nov. 2019. <http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/1374/1/012005>.

SUN, H. *et al.* Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 1275-1284, Apr. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.043>.

SU, L. *et al.* Short-chain aliphatic ester synthesis using *Thermobifida fusca* cutinase. **Food Chemistry**, v. 206, p. 131-136, Sept. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.051>.

TAVARES, F. *et al.* Use of castor bean seeds as lipase source for hydrolysis of crambe oil. **Industrial Crops And Products**, v. 124, p. 254-264, Nov. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.073>.

THAPA, S. *et al.* Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 8, p. 579-601, June. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-019-00187-1>.

TIZCHANG, S. *et al.* Immobilization of  $\beta$ -galactosidase by halloysite-adsorption and entrapment in a cellulose nanocrystals matrix. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1865, n. 6, p. 129896, June. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129896>.

UGO, A. K. *et al.* Microbial Lipases: a prospect for biotechnological industrial catalysis for green products. **Fermentation Technology**, v. 06, n. 02, p. 1-12, 2017. <http://dx.doi.org/10.4172/2167-7972.1000144>.

ULRICH, L. G. *et al.* Imobilização de beta-galactosidase utilizando a técnica clea (cross-linked enzyme aggregates). **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 4, p. 1680-1685, July 2017. <http://dx.doi.org/10.5151/chemeng-cobeqic2017-298>.

U.S. Food and Drug Administration. Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used

in Food (Partial List). 2018. Disponível em:  
[https://www.thelancet.com/journals/lanpsy/article/PIIS2215-0366\(19\)30292-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanpsy/article/PIIS2215-0366(19)30292-5/fulltext).  
 Acessado: 11 agosto 21.

VENKATESAGOWDA, B. *et al.* Solid-state fermentation of coconut kernel-cake as substrate for the production of lipases by the coconut kernel-associated fungus *Lasiodiplodia theobromae* VBE-1. **Annals Of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 129-142, 2014.

WAN, G. Z. *et al.*  $\alpha$ -Glucosidase immobilization on magnetic core-shell metal-organic frameworks for inhibitor screening from traditional chinese medicines. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 205, p. 111847, Sept. 2021.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111847>.

WANG, W. *et al.* Comparison of covalent and physical immobilization of lipase in gigaporous polymeric microspheres. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, v. 38, n. 11, p. 2107-2115, Sept. 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-015-1450-3>

WANG, Z. *et al.* Study on improving the stability of adsorption-encapsulation immobilized laccase@ZIF-67. **Biotechnology Reports**, v. 28, p. e00553, Dec. 2020,  
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00553>.

WEIDLICH, S. *et al.* Secretion of lipases in the digestive tract of the cricket *Gryllus bimaculatus*. **Archives Of Insect Biochemistry And Physiology**, v. 90, n. 4, p. 209-217, Oct. 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/arch.21303>.

YADAV, A. N. *et al.* Biodiversity and biotechnological applications of psychrotrophic microbes isolated from indian himalayan regions. **Ec Microbiology Editor's Column**, p. 48-54, 2017.

XU, M. Q. *et al.* Combined cross-linked enzyme aggregates as biocatalysts. **Catalysts**, v. 8, n. 10, p. 460, Oct. 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/catal8100460>.

XU, M. *et al.* Preparation and assessment of cross-linked enzyme aggregates (cleas) of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus leichmannii* 313. **Food and Bioprocess Processing**, v. 124, p. 82–96, Nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.004>.

YELE, V. U.; DESAI, K. A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri*; optimization of media and production conditions using statistical methods. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 175, n. 2, p. 855-869, Oct. 2014.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s12010-014-1331-2>.

ZARAI, Z. *et al.* Purification and biochemical properties of *Hexaplex trunculus* digestive lipase. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2434-2439, Dec. 2012.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.10.004>.

ZAREVCKA, M. Olive oil as inductor of microbial lipase. **Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties And Bioconversions**, p. 457-470, Feb. 2012.  
<http://dx.doi.org/10.5772/30109>.

ZARE, A. *et al.* *Candida rugosa* lipase immobilization on various chemically modified

chromium terephthalate MIL-101. **Journal Of Molecular Liquids**, v. 254, p. 137-144, Mar. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2018.01.097>.

ZARINVIARSAGH, M.; EBRAHIMIPOUR, G.; SADEGHI, H. Lipase and biosurfactant from *Ochrobactrum intermedium* strain MZV101 isolated by washing powder for detergent application. **Lipids In Health And Disease**, v. 16, n. 1, p. 1-13, Sept. 2017. <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-017-0565-8>.

ZEHANI, N. *et al.* A microconductometric biosensor based on lipase extracted from *Candida rugosa* for direct and rapid detection of organophosphate pesticides. **International Journal Of Environmental Analytical Chemistry**, v. 95, n. 5, p. 466-479, Apr. 2015. <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2015.1036864>.

ZHOU, X. *et al.* Simultaneously achieve soluble expression and biomimetic immobilization of *Candida antarctica* lipase B by introducing polyamine tags. **Journal Of Biotechnology**, v. 249, p. 1-9, May. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.015>.

ZHU, Y. *et al.* Covalent laccase immobilization on the surface of poly (vinylidene fluoride) polymer membrane for enhanced biocatalytic removal of dyes pollutants from aqueous environment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 191, p. 111025, July 2020. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111025>.

ZULKIFLI, N. N.; RASIT, N. Lipase production from solid state fermentation of copra waste associated fungus *Aspergillus niger*. **University Malaysia Terengganu Journal Of Undergraduate Research**, v. 2, n. 2, p. 33-40, 2020.

## 2.2 PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE UM AGREGADO ENZIMÁTICO RETICULADO DE LIPASE PRODUZIDA POR *ASPERGILLUS NIGER*

Santos, M. R.<sup>1</sup>; Hirata, D. B.<sup>2</sup>; Mendes, A. A.<sup>3</sup>; Angelotti, J. A. F.<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Mestranda em Biotecnologia, Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Centro – Alfenas – MG, CEP 37130-001 myllena.rodrigues@sou.unifal-mg.edu.br

<sup>2</sup> Professora Dr. em Engenharia Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Centro – Alfenas – MG, CEP 37130-001 daniela.hirata@unifal-mg.edu.br

<sup>3</sup> Professor Dr. em Engenharia Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Centro – Alfenas – MG, CEP 37130-001 adriano.mendes@unifal-mg.edu.br

<sup>4</sup> Professora Dra. em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Centro – Alfenas – MG, CEP 37130-001 joelise.angelotti@unifal-mg.edu.br

### **Resumo**

A lipase é uma enzima que tem se destacado no setor biotecnológico por ser um biocatalisador com funções hidrolíticas e de síntese, ampliando suas possibilidades de aplicação. Sua utilização tem sido estudada em muitos processos industriais como alimentos, farmacêutico, cosmético, biocombustíveis e tratamento de efluentes. Apesar de possuir inúmeras vantagens a imobilização dessas enzimas seria interessante afim de melhorar as suas características principalmente tornando-as mais estáveis e com capacidade de reutilização. Uma metodologia interessante para imobilizar enzimas são os chamados CLEAs que promovem a imobilização mediante a precipitação e reticulação enzimática. O objetivo desse trabalho foi produzir CLEAs de lipase de *Aspergillus niger* e investigar os parâmetros que afetam a atividade do biocatalisador além de comparar suas características com a enzima livre, em conjunto o trabalho avaliou a capacidade de esterificação da enzima livre e imobilizada. A maior produtividade da

enzima (7,32 U/ml) foi obtida com 72 horas de fermentação. A imobilização pelo método de CLEAs permitiu uma recuperação de atividade em torno de 85%. A enzima imobilizada mostrou-se mais estável na sua temperatura ótima, em pHs ácidos e neutros e revelou-se mais estável frente ao período de armazenamento estudado. A lipase imobilizada apresentou uma porcentagem de conversão de esterificação de 32% obtida em 6 horas de reação, essa enzima se mostrou promissora podendo ser reutilizada por até 4 ciclos consecutivos, demonstrando dessa maneira seu potencial em aplicações industriais.

### 2.2.1 Introdução

Na área de Biotecnologia as lipases têm se destacado há mais de três décadas, isso está relacionado a várias características como sua versatilidade em catalisar reações de hidrólise e síntese, além das suas funcionalidades e caráter interfacial (SALAZAR CARRANZA, *et al.*, 2020). A lipase é um biocatalisador e tem como função principal hidrolisar triacilgliceróis em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol (JAVED, *et al.*, 2018), além disso, suas propriedades catalíticas incluem reações de esterificação, interesterificação e transesterificação (RMILI *et al.*, 2019). Embora as lipases sejam produzidas por fontes vegetais e animais, os microrganismos são considerados preferivelmente como fontes potenciais para a obtenção das lipases em escala industrial, e dentre eles os fungos e leveduras se destacam devido seu maior rendimento com relação a sua produção enzimática (FERRAZ *et al.*, 2018). Em especial o *Aspergillus niger* tem se mostrado um dos melhores produtores de lipase, uma espécie de fungo filamentosos registrado como GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos (UTAMI *et al.*, 2017). Um levantamento feito por Santos *et al.*, (2018) revelou que resíduos agroindustriais tem sido comumente utilizado com êxito como substrato na FES para obtenção enzimática principalmente com o uso do fungo *Aspergillus niger* como agente biológico.

Por serem catalisadores biológicos altamente específicos que atuam acelerando as reações químicas de forma seletiva (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011) a utilização da lipase tem sido abordada em muitos processos industriais. Setores como produção alimentícia, indústria química, produção de biodiesel, indústrias farmacêuticas, tratamento de efluentes são exemplos de áreas beneficiadas pelo uso de lipases (MELANI *et al.*, 2020).

Apesar das enzimas serem consideradas catalisadores eficazes algumas enzimas são sensíveis a variações de pH e temperatura podendo sofrer uma termoinativação, (THANGARAJ; SOLOMON, 2019), outras limitações a seu uso incluem a dificuldade de

recuperação para reuso e falta de estabilidade operacional (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). Dessa maneira o advento da imobilização tem sido adotado para reverter alguns inconvenientes das enzimas em sua forma solúvel, essa prática ainda permite a aplicação repetida da mesma em muitos lotes cíclicos (THANGARAJ; SOLOMON, 2019).

A imobilização enzimática permite a formação de biocatalisadores com propriedades catalíticas e operacionais adequadas, requisitos esses para diversas aplicações industriais (SOUZA *et al.*, 2017). As vantagens da imobilização enzimática incluem uma melhor estabilidade da enzima frente a variações de pH e temperatura. A imobilização oferece benefícios na etapa de separação da enzima do meio reacional, isso permite que a enzima seja reciclada para posterior uso (BILIAL *et al.*, 2019). A imobilização baseia-se na retenção da enzima em um sistema analítico, sendo que biomoléculas se ligam em uma matriz insolúvel (suporte) (SOUZA *et al.*, 2017). No entanto, o uso de suportes na imobilização acarreta em maior custo ao final do processo (RODRIGUES *et al.*, 2019), dessa forma estratégias de imobilização sem suportes devem ser consideradas afim de diminuir os custos de produção.

A imobilização de enzimas é uma tecnologia que permite melhorar as características das enzimas. A adequação de suas propriedades operacionais e catalíticas possibilitam o uso das enzimas em diversos segmentos industriais. Muitos métodos de imobilização foram desenvolvidos, no entanto não há uma metodologia que se aplica a todas as enzimas, dessa maneira é necessário avaliar e escolher um método que acarrete em menor custo, que seja de simples execução, sustentável, que permita uma boa retenção de atividade além de proporcionar uma alta estabilidade operacional (SOUZA, L.T. *et al.*, 2017).

Um método de imobilização proposto por Sheldon *et al.*, (2009) conhecido como Agregados Enzimáticos Reticulados (CLEAs) tem chamado atenção por eliminar a necessidade de uso de suportes. Inicialmente as enzimas são precipitadas pela adição de um agente precipitador, que pode ser pelo uso de sais, solventes orgânicos miscíveis em água ou polímeros não iônicos (SHELDON, 2007), O uso diferentes agentes precipitadores tem sido reportados por diversos autores na imobilização de lipases pela técnica de CLEAs: acetona (ALVES, *et al.*, 2021), etanol (RAMOS *et al.*, 2018), sulfato de amônio (ZHU *et al.*, 2021), isopropanol, polietilenoglicol (PEG 800) (ZHANG *et al.*, 2017), t-butanol, acetonitrila (DIAZ-VIDAL *et al.*, 2019), éter monometílico de dietilenoglicol (DEGME), 1,2-dimetoxietano (DME) terc- butanol (VETEIKYTÈ *et al.*, 2017). Em seguida através do uso de agentes reticuladores as enzimas formam reticulados com determinados aminoácidos que se encontram na superfície enzimática (WAHAB *et al.*, 2020). Essa técnica apresenta várias vantagens no que se refere seu uso nas aplicações industriais como simplicidade, baixo custo, possibilidade de aplicação em várias

enzimas, fatos esses, desejáveis nas biotransformações industriais (SHELDON; SCHOEVAART; VAN LANGEN, 2005).

As lipases imobilizadas apresentam-se mais estáveis e mais resistentes, dessa maneira tem sido empregadas em várias reações de interesse industrial, principalmente na indústria alimentícia (FACIN *et al.*, 2019). No setor alimentício as lipases são empregadas na produção de aromatizantes alimentares que proporcionam odor semelhante aos naturais mais complexos (TRBOJEVIĆ IVIĆ *et al.* 2016). As rotas biotecnológicas para produção de aromas naturais tem se desenvolvido nos últimos anos, as preparações enzimáticas são alternativas vantajosas comparadas aos métodos tradicionais, sua utilização na produção de sabores naturais tornam os aditivos mais adequados para o consumo (AKACHA; GARGOURI, 2015) seu uso apresenta características atraentes para indústrias, como processos economicamente mais viáveis, condições de reações mais suaves, além da melhor especificidade e seletividade e que conferem produtos com maior grau de pureza e qualidade (BARROS *et al.*, 2011).

A maioria dos estudos de produção dos CLEAs de lipases estão concentrados com uso de enzimas comerciais, desta maneira o objetivo deste estudo foi produzir a lipase pelo *A. niger* e imobiliza-las pela metodologia de CLEAs e investigar os parâmetros que afetam a atividade do biocatalisador. As propriedades catalíticas da enzima livre e imobilizada foram comparadas, como temperatura e pH de atividade e estabilidade e estabilidade de armazenamento. Na sequência os CLEAs de lipase e a enzima solúvel foram utilizados na síntese do éster butirato de isoamila via esterificação.

## 2.2.2 Metodologia

### 2.2.2.1 Ativação do microrganismo e preparo do inóculo

Foram utilizados nesses experimentos o fungo *Aspergillus niger* (C883700) da coleção do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas cedido ao Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal de Alfenas. Os fungos foram reativados e mantidos em tubos contendo ágar batata dextrose (ABD), e um segundo repique foi realizado em tubos inclinados contendo o mesmo meio e incubados a 30°C até o crescimento adequado das colônias. Para o preparo do inóculo foram adicionados ao tubo de ensaio 10 ml de solução tween 20 estéril a 0,3% v/v com o auxílio de uma alça foi feita a raspagem para desprender os esporos. Em seguida 1 ml da suspensão foi retirada e adicionada ao meio de esporulação, formulado em triplicata em frascos erlenmeyeres

de 125 ml contendo 10 g de farelo de trigo e 4 ml de solução salina composta de 1,7% p/v de NaHPO<sub>4</sub> e 2% p/v de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> cada. Os meios de esporulação foram mantidos a 30°C por 96 horas. A extração da suspensão para contagem das células foi realizada adicionando 50 ml do tween 20 estéril (0,3%), os esporos foram extraídos e filtrados em gaze estéril, uma diluição 1:50 foi feita para a contagem na câmara de Neubauer em microscópio óptico para determinar a concentração necessária. Após a contagem, uma fórmula foi aplicada para determinar a quantidade de inóculo utilizado na fermentação.

$$V = \frac{\text{gramas do meio de fermentação} \times \text{carga de microrganismo desejada}}{\text{n}^\circ \text{ de células/ml da suspensão original}} \quad (1)$$

Onde: V é volume da suspensão a ser inoculada.

#### 2.2.2.2 Produção e extração da enzima

O meio de fermentação foi composto da seguinte maneira: 100 g de farelo de trigo e umedecido com 65 ml de solução de sais (100 ml de água, 1,5 g de glicose, 0,75 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,34 g ureia, 1,8 g de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,045 g de MgSO<sub>4</sub> e 0,0375 g de CaCl<sub>2</sub>) ao meio ainda foi adicionado 1,5 g de azeite de oliva como indutor. Em frascos enlenmeyres de 250 ml foram adicionados 10 g do meio de fermentação. Os frascos foram autoclavados a 121°C, por 20 minutos. Os frascos foram inoculados com a suspensão de esporos contendo 10<sup>7</sup> de esporos/g, homogeneizados e incubados a 30°C por 10 dias. Foi realizado o acompanhamento da produção da enzima, e a cada 24 horas erlenmeyeres foram retirados e a enzima extraída utilizando 100 ml de água destilada, e filtrada usando gaze estéril. O extrato bruto obtido foi armazenado em tubos falcon de 50 ml e preservados congelados para posteriormente ser determinado a atividade enzimática.

#### 2.2.2.3 Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade lipásica foi realizada pelo método titulométrico descrito por Burkert, Maugeri e Rodrigues (2004) com modificações. Foram preparados uma emulsão de 50 ml de azeite e 50 ml de goma arábica a 7% m/v. A atividade foi medida incubando uma mistura composta de 4,8 ml de tampão fosfato sódio (100mM) pH 7,0 e 5 mL da emulsão, pré equilibrado a 37°C, e em seguida foi adicionado 0,2 ml do extrato bruto e a mistura reacional

foi incubada por 5 min, a 37°C com agitação a 200 RPM. A reação foi paralisada através da adição de 10 mL da mistura acetona-etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos presentes foram titulados com uma solução de NaOH (20mM), a fenolftaleína foi utilizada como indicador e o ponto de viragem foi detectado pelo surgimento de uma coloração rósea no meio. A média aritmética dos valores foi utilizada para o cálculo da atividade enzimática. Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas (MACÊDO *et al.*, 1997).

$$AE \text{ (U/mL)} = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 1000}{t \times V_c} \quad (2)$$

Onde:

AE é a atividade lipásica (U/mL);

V<sub>a</sub> é o volume da amostra titulada (mL);

V<sub>b</sub> é o volume da branco titulado (mL);

M é a molaridade da solução de NaOH (N);

t é o tempo de reação em minutos;

V<sub>c</sub> é o volume da amostra utilizada na reação (mL).

#### 2.2.2.4 Determinação do teor de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

#### 2.2.2.5 Preparação dos CLEAs

##### 2.2.2.5.1 Seleção do agente precipitante

O efeito de diferentes agentes precipitantes na recuperação da atividade da lipase foi avaliado. Os CLEAs foram preparados usando acetona, álcool metílico, álcool butílico secundário (2-butanol), álcool iso butílico (butanol), álcool n – butílico (1-butanol), álcool n-propílico (1-Propanol), 3-methylbutanol, álcool etílico absoluto (etanol), acetonitrila e acetato de etila como agente precipitante. A precipitação ocorreu adicionando o extrato bruto enzimático ao solvente pré-resfriado (proporção 1:4), a mistura seguiu com agitação a 150 RPM por 30 min a 4°C. Posteriormente a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm, por 5 min a 4°C para separar o precipitado do sobrenadante, após a etapa de separação foi adicionado tampão fosfato de sódio (pH 7) para ressuspender o precipitado. A atividade enzimática e o teor de proteínas

foram determinados no precipitado e no sobrenadante conforme item 2.2.2.3 e 2.2.2.4, respectivamente. O solvente que apresentou maior atividade lipásica no precipitado foi escolhido para dar segmento na preparação dos CLEAs.

#### *2.2.2.5.2 Protocolo de preparação dos CLEAs*

Os CLEAs foram preparados de acordo com GUPTA E RAGHAVA (2011), com modificações. Após a seleção do agente precipitante que proporcionou uma melhor eficiência em termos de precipitação e atividade enzimática, esse agente foi utilizado para a preparação dos agregados reticulados na presença de glutaraldeído como agente reticulador e de Albumina de Soro Bovino (BSA) como proteína espaçadora.

Primeiramente, os parâmetros concentração de proteína espaçadora (1–10 mg/mg) e glutaraldeído (0–50 mM) foram estudados pela metodologia de planejamento experimental. Após a precipitação das proteínas presentes no extrato bruto enzimático, adicionado de proteína espaçadora e o agente precipitante selecionado conforme descrito no item 2.5.1, o precipitado foi submetido à reticulação usando glutaraldeído, sob agitação a 150 RPM a 10°C por um tempo de incubação de 60 min. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 0,5 mL de solução tampão Tris 100 mM, pH 8.0. O tubo contendo o meio reacional foi então centrifugado a 14.000 RMP e 4°C por 10 min. Os CLEAs foram lavados três vezes com o tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 para remover o excesso de glutaraldeído e então o precipitado foi ressuspensão em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 e armazenados a 4°C para ensaios de caracterização bioquímica.

#### *2.2.2.6 Otimização dos parâmetros de preparação dos CLEAs utilizando metodologia de planejamento experimental*

A ferramenta de planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  (incluindo 11 ensaios, sendo 4 deles nas condições axiais e 3 repetições no ponto central), foi utilizada para avaliar a influência das variáveis independentes: concentração de agente reticulante e proteína espaçadora na atividade dos CLEAs. As variáveis e os níveis estudados estão descritos na tabela 7 e a matriz do planejamento fatorial completo está descrita na tabela 8.

Tabela 7 - Variáveis e níveis estudados

Variável	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
X1 AE*	0,0	1,37	4,69	8,00	9,37
X2 AR** (mM)	1,0	8,12	25,50	42,88	50,0

\*AE: Agente espaçador – Albumina de soro bovino

\*\*AR: Agente reticulante – Glutaraldeído.

Tabela 8 - Matriz do planejamento fatorial utilizado

Ensaio	Variável codificada	
	AE (X1)	AR (X2)
01	1	-1
02	1	-1
03	-1	1
04	1	1
05	-1,41	0
06	1,41	0
07	0	-1,41
08	0	1,41
09	0	0
10	0	0
11	0	0

AE: Agente espaçador – Albumina de soro bovino

AR: Agente reticulante – Glutaraldeído.

A variável resposta foi a atividade de lipase determinada de acordo com o item 2.2.2.3 e os resultados foram analisados pelo uso do software Statistica7.0®.

### 2.2.2.7 Caracterização Morfológica

#### 2.2.2.7.1 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia da enzima livre e imobilizada por CLEAs foi analisada por microscopia

eletrônica de varredura. Para esse efeito, utilizou-se um microscópio Zeiss Supra 35VP com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (FEG-SEM), trabalhando a 10 a 25 keV. O preparo das amostras foi realizado pulverizando o pós-seco diretamente sobre o substrato silício. Este procedimento permitiu uma melhor visualização dos detalhes morfológicos das amostras.

#### *2.2.2.7.2 Análise Termogravimétrica*

O comportamento térmico das amostras foi estudado utilizando um equipamento da marca NETZSCH modelo TG 209 F1 com razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  em atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  com vazão de  $20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A temperatura empregada variou de 25 à  $800^{\circ}\text{C}$  em suporte de alumina usando  $10,101 \pm 1,295$  mg das amostras.

#### *2.2.2.8 Caracterização bioquímica*

##### *2.2.2.8.1 Determinação da temperatura ótima de atividade*

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinado incubando-se uma alíquota da enzima livre e imobilizada em emulsão azeite/goma arábica em tampão fosfato pH 7,0, 0,1 M em temperaturas de  $30^{\circ}\text{C}$  a  $80^{\circ}\text{C}$  por 5 min. A reação foi interrompida e atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 2.2.2.3.

##### *2.2.2.8.2 Determinação do pH ótimo de atividade*

O efeito do pH sobre a atividade enzimática dos CLEAs e da enzima livre foi determinada incubando-se as alíquotas em emulsão azeite/goma arábica em soluções tampão na faixa de pH 4.0 a 10.0, (0,1 M) por 5 min na temperatura ótima de atividade. A reação foi interrompida e atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 2.2.2.3.

##### *2.2.2.8.3 Determinação do pH e temperatura de estabilidade*

Os ensaios de termoestabilidade foram realizados no pH ótimo de atividade da enzima. Na ausência de substrato, as enzimas foram incubadas na solução tampão em temperaturas na faixa de  $30$  a  $50^{\circ}\text{C}$ , durante o tempo máximo de 2 horas. Em intervalos de tempo de 20 minutos

de incubação, alíquotas foram retiradas para realização da determinação da atividade residual da enzima, como descrito no item 2.2.2.3.

Os ensaios de estabilidade ao pH foram realizados na temperatura ótima de atividade. Descrevendo brevemente, na ausência de substrato, a enzima livre e CLEAs foram incubadas nas soluções tampão na faixa de pH 4,0 a 10,0, durante o tempo máximo de 2 horas. Em intervalos de tempo de 20 minutos de incubação, alíquotas foram retiradas para realização da determinação da atividade residual da enzima, como descrito no item 2.2.2.3.

#### *2.2.2.8.4 Parâmetros termodinâmicos*

A partir dos dados de estabilidade térmica foram calculados as constantes de inativação térmica  $k_d$ , tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), e fator de estabilidade (FE). As constantes de inativação e o tempo de meia-vida foram determinadas aplicando o modelo de decaimento exponencial não linear proposto por Sadana e Henley (1987). O parâmetro fator de estabilidade foi obtido pela razão entre o tempo de meia-vida da enzima imobilizada e da enzima livre.

#### *2.2.2.8.5 Estabilidade de armazenamento*

A determinação de vida de prateleira dos derivados e da enzima livre foram realizados através do acompanhamento da atividade enzimática durante um intervalo de tempo de 100 dias. As amostras de enzima livre e enzima imobilizada foram armazenadas a 4°C e a atividade hidrolítica residual foi determinada em intervalos de tempo entre 15 e 40 dias.

#### *2.2.2.9 Síntese de éster butirato de isoamila*

##### *2.2.2.9.1. Estabilidade em solvente orgânico*

Para avaliar a estabilidade dos CLEAs em solvente orgânico os agregados foram ressuspensos em heptano. Na ausência de substrato, os CLEAs foram incubados no intervalo de 24 horas a temperatura de 40°C e sob agitação 200 RPM. Em intervalos de tempo de 1, 3, 6, 8, 16 e 24 horas de incubação foram realizados a determinação da atividade para avaliar a atividade residual da enzima, como descrito no item 2.2.2.3.

### 2.2.2.9.2 Condições das reações de esterificação

A reação de esterificação foi conduzida em frasco schott fechado contendo 10 mL de volume reacional. O sistema padrão para os testes foi composto por álcool isoamílico e ácido butírico (razão molar 1:1 e concentração do álcool e ácido 0,2 M) na presença do solvente heptano. No meio reacional foram adicionados 5% m/v da enzima imobilizada. Os frascos foram incubados em banho termostatizado a 40°C com agitação 240 RPM por um período de 24 horas. Alíquotas de 1,0 mL foram coletadas nos intervalos de tempo 1, 3, 6, 10 e 24 horas para determinação da porcentagem de esterificação conforme item 2.2.2.9.3.

### 2.2.2.9.3 Determinação da porcentagem de esterificação

Foram retiradas alíquotas (1 mL) do meio reacional e adicionadas em 10 mL de álcool/acetona (1:1) com 3 gotas de fenolftaleína, em seguidas foram tituladas com solução de NaOH (0,2 M). A conversão foi determinada conforme a equação (3). Ensaios sem a adição da enzima foram realizados como controle.

$$\text{Conversão (\%)} = \left( \frac{V_0 \text{ NaOH} - V_t \text{ NaOH}}{V_0 \text{ NaOH}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde:

$V_0 \text{ NaOH}$  = é o volume de NaOH inicial no meio reacional

$V_t \text{ NaOH}$  = é o volume de NaOH final no tempo x.

### 2.2.2.10 Estabilidade operacional do biocatalisador

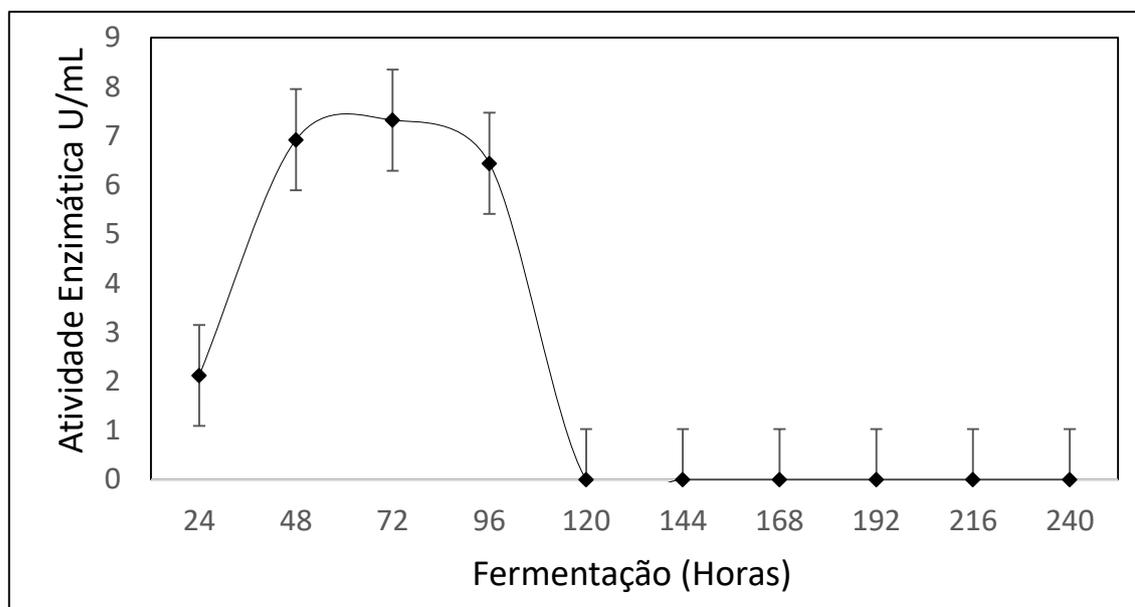
A determinação da estabilidade operacional do biocatalisador foi realizada através do avaliação da reutilização do biocatalisador em sucessivos ciclos de reação de produção dos ésteres sob condições descritas no item 2.2.2.9.2. Ao final da reação, o biocatalisador foi lavado com hexano gelado (4°C), para eliminar quaisquer produtos residuais ou espécies de substrato, seco sob vácuo à temperatura ambiente e introduzido em um novo meio reacional com reagentes frescos. As taxas de conversão obtidas no primeiro ciclo foi tomada como referência (100%) para avaliar a conversão relativa dos demais ciclos após cada uso.

## 2.2.3 Resultados e discussão

### 2.2.3.1 Produção da lipase pelo *Aspergillus niger*

A produção da lipase pelo fungo *A. niger* foi acompanhada ao longo do processo fermentativo conforme apresentado no Gráfico 1. A influência do tempo de cultivo na produção da enzima foi realizada com o intuito de identificar o tempo de maior produtividade de lipase pelo fungo *A. niger*. De acordo com o gráfico podemos observar que os valores mais altos de atividade foram obtidos entre os tempos de 48 e 96h de fermentação, sendo o pico de atividade enzimática máxima (7,32 U/ml) com 72 horas de fermentação.

Gráfico 1 – Influência do tempo de cultivo para a produção de enzima lipase de *A. niger* em meio contendo farelo de trigo, solução de salina e azeite de oliva como indutor.



O tempo de fermentação desse estudo foi inferior ao encontrado por El-Ghonemy *et al.* (2020) que obtiveram a atividade máxima da lipase produzida por *A. niger* em FES utilizando o farelo de trigo como substrato após 7 dias de fermentação. O pico máximo de atividade da lipase em 72 horas também ocorreu em uma pesquisa desenvolvida por Mukhtar *et al.* (2015), onde o melhor rendimento foi obtido em 72 horas de fermentação e uma diminuição gradual da atividade é vista após 96 horas de incubação. Esse declínio na atividade enzimática pode ser atribuído a vários fatores como depleção de nutrientes, alterações no pH ou uma possível desnaturação da enzima provocada pela interação com demais componentes (JAIN; NAIK, 2018).

Geralmente a presença de lipídios no meio de fermentação age como indutor estimulando a produção da lipase, consequentemente aumentando o nível de atividade lipásica (UTAMI *et al.*, 2017). O uso do azeite de oliva foi selecionado como agente indutor afim de melhorar o rendimento enzimático. De acordo com a literatura especializada o azeite de oliva é caracterizado como um indutor eficiente na produção da lipase devido conter em sua composição a trioleína, um lipídio com maior facilidade de ser assimilado pelos microrganismos (SUMATHY; SUMATHY; DEECARAMAN, 2012). Em um estudo desenvolvido por Putri *et al.* (2020) foram investigados os efeitos de três indutores (azeite, óleo de gergelim e óleo de jatropa) sobre a atividade da lipase de *A. niger* e foram verificados maiores rendimentos quando empregado 1% de azeite no meio de fermentação. Na literatura é possível encontrar diversos trabalhos utilizando o azeite de oliva como agente indutor na produção de lipases microbianas (ROMANO *et al.*, 2020; PATEL *et al.*, 2020; SETHI; NANDA; SAHOO, 2016; SILVA *et al.*, 2016).

O meio de cultivo contendo farelo de trigo, adicionado de solução de sais e a utilização do azeite de oliva como indutor nesse trabalho foi eficiente para a produção da enzima lipase com uma atividade interessante e esse fato pode ser atribuído ao uso de resíduos agroindustriais suplementados com fontes de nitrogênio, carbono, e a adição de indutores potencializam a produção enzimática (GUEDES *et al.*, 2021). Além disso, a associação do farelo de trigo com o azeite de oliva permite uma boa produtividade de lipase em FES, devido as propriedades nutricionais do farelo de trigo e sua capacidade em se manter solto mesmo em circunstâncias úmidas proporciona uma ampla área de superfície para o inóculo (KUMAR; RAY, 2014).

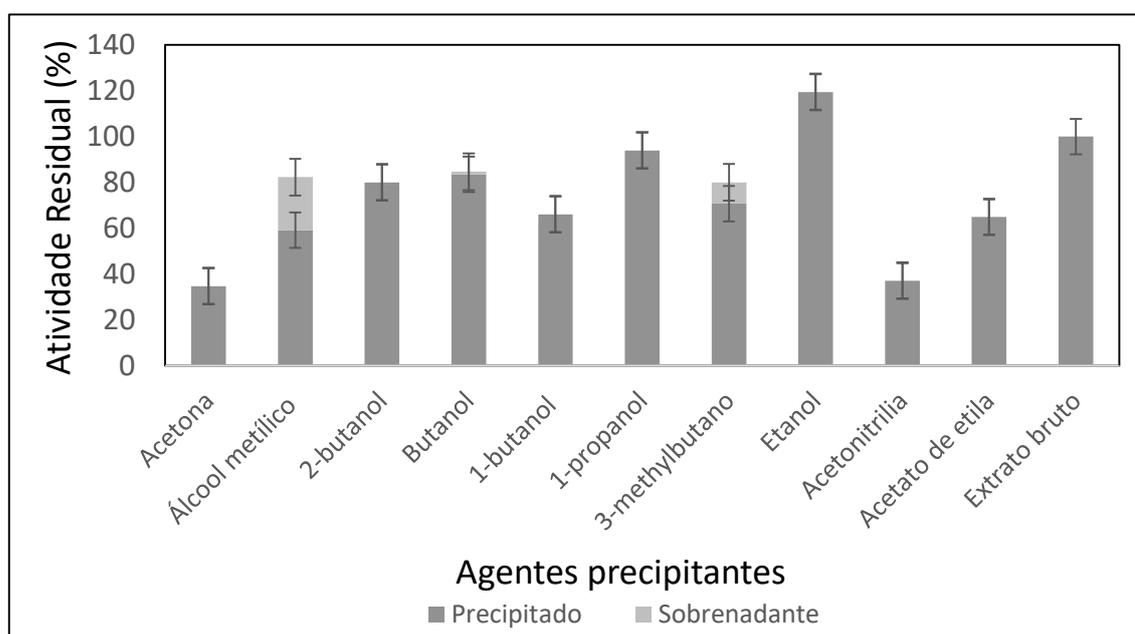
#### 2.2.3.2 Seleção do agente precipitante e quantificação de proteínas

Neste presente trabalho realizou uma triagem para selecionar o melhor agente precipitante, o solvente que proporcionasse a melhor retenção de atividade no precipitado foi utilizado na imobilização por CLEAs. Foram avaliados dez solventes na precipitação da lipase do extrato bruto, todos os agentes permitiram a precipitação da lipase e proporcionaram a recuperação da atividade no precipitado após ser ressuspensa em tampão fosfato de sódio (pH 7).

A atividade enzimática residual (%) e concentração de proteína são apresentados nos Gráficos 2 e 3. Conforme observado nos gráficos, diferentes solventes orgânicos foram utilizados na precipitação da enzima, e as atividades enzimáticas foram determinadas para cada solvente empregado. Independente do agente precipitante, foi observado eficiente precipitação

da proteína nas condições experimentais usadas. No entanto o rendimento dos CLEAs está intimamente ligado ao tipo de precipitante utilizado pois a etapa de agregação pode ser afetada pelas propriedades do precipitante (YAMAGUCHI; KIYOTA; MIYAZAKI, 2018). Os diferentes rendimentos obtidos nas precipitações podem estar relacionados aos variados mecanismos de agregação de cada solvente como modificações no estado de hidratação das moléculas ou modificações na constante eletrostática da solução (CUI; JIA, 2013).

Gráfico 2 - Atividade residual (%) da lipase frente a diversos agentes precipitantes.



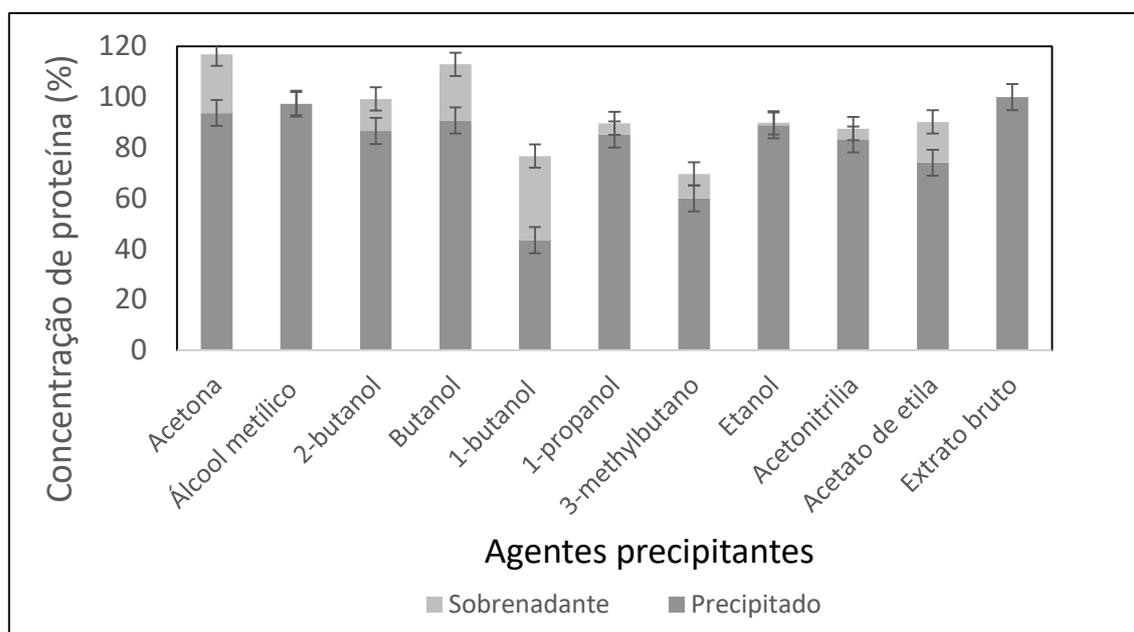
As melhores atividades obtidas foram alcançadas com o uso do etanol, 1-propanol e butanol respectivamente. Considerando os resultados obtidos e analisando as características particulares desses três solventes o etanol foi selecionado como o melhor agente precipitante para dar continuidade nas análises posteriores. O uso do etanol demonstrou uma boa performance na precipitação uma vez que foi possível obter bons rendimentos em termos de atividade da lipase. Isso reflete em um resultado positivo uma vez que se trata de um solvente de baixo custo, baixa toxicidade, de natureza renovável e ecologicamente correto (AMARAL-FONSECA *et al.*, 2018).

O etanol tem se mostrado o melhor agente precipitante em outros estudos, como relatado por Ramos *et al.* (2018) que investigou a influência de três precipitantes: solução saturada de sulfato de amônio, acetona e etanol hidratado, em seu estudo o rendimento máximo de atividade foi obtido com o uso do etanol em uma relação de volume de solução enzimática: etanol de 1:3,

com a adição da proteína de soja como proteína espaçadora e glutaraldeído como agente reticulante em uma proporção de 10  $\mu\text{mol}$  de glutaraldeído/mg de proteína total, essas condições otimizadas proporcionaram uma recuperação de atividade em torno de 40%. A precipitação da lipase de pâncreas suíno com o etanol também foi realizada em um estudo desenvolvido por Guimarães *et al.*, (2018) e nas condições otimizadas produziram CLEAs com alta retenção de atividade com cerca de 80% da atividade recuperada.

Entretanto alguns autores obtiveram a maior atividade enzimática com o uso de outros agentes precipitantes, a lipase de *Aspergillus niger* foi estudada por Muley *et al.*, (2021) vários agentes foram rastreados para a precipitação da enzima como metanol, etanol, iso-propanol, n-butanol, acetona e acetonitrila e sulfato de amônio, em seu estudo a maior recuperação de atividade ( $71,75 \pm 3,04\%$ ) foi obtida a partir de precipitação com n-butanol. Um trabalho desenvolvido por Yang e Zhang (2019) a lipase de *Burkholderia cepacia* foi precipitada por diversos solventes orgânicos miscíveis em água (acetona, etanol e 2-propanol) além do PEG 800 e sulfato de amônio, no entanto o etanol foi o agente precipitante que forneceu uma menor recuperação de atividade, sendo a maior atividade recuperada com o uso do sulfato de amônio. Uma possível explicação para esses resultados quando comparado ao do atual estudo está relacionada ao fato de que a recuperação da atividade enzimática depende fortemente da fonte microbiana ao qual se obteve a enzima, presume-se que as lipases obtidas de diferentes fontes possuam superfícies glicosiladas distintas o que acarreta em diferentes propriedades biofísicas, que podem resultar em diferentes agregações fazendo com que a condição ideal de precipitação varie de uma enzima para outra (YAMAGUCHI; KIYOTA; MIYAZAKI, 2018). Dessa maneira enzimas de fontes diferentes necessitam da otimização dos parâmetros de precipitação pois essa variável influencia fortemente na preparação dos CLEAs (XU *et al.*, 2018).

Gráfico 3 – Concentração de proteínas (%) frente a diversos agentes precipitantes



O uso de solventes miscíveis em água proporcionam a precipitação de proteínas devido a diminuição da camada de solvatação em torno da proteína desse modo ocorre o deslocamento da água presente na superfície proteica, como resultado as moléculas menos hidratadas sofrem agregação por meio de forças eletrostáticas e dipolares (KULKARNI *et al.*, 2020). Dessa forma a natureza do precipitante reflete diretamente na recuperação da atividade, portanto a triagem de vários solventes orgânicos é fundamental (SHELDON, 2011).

2.2.3.3 Otimização dos parâmetros de preparação dos CLEAs utilizando metodologia de planejamento experimental.

Experimentos preliminares para a produção dos CLEAs mostraram que dentre os três solventes com melhor desempenho (butanol, 1-propanol e etanol), o etanol proporcionou a maior recuperação de atividade, dessa maneira seu uso foi definido para as próximas etapas. Um planejamento experimental foi realizado para avaliar a influência das variáveis independentes concentração de agente reticulante e proteína espaçadora na atividade dos CLEAs. Na tabela 9 podemos analisar as condições empregadas nos 11 ensaios realizados e os resultados obtidos para cada combinação das variáveis. Entretanto após análise dos resultados obtidos no planejamento pelo teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade da população de dados, foi constatado que os dados obtidos não provinham de uma distribuição normal, dessa maneira não sendo possível a análise estatística pelo Planejamento Experimental

utilizando o software Statistica, no entanto os resultados obtidos foram utilizados como uma triagem das variáveis mencionadas.

Após observarmos os ensaios verificamos que uma alta atividade recuperada (85,11%) foi evidenciada nas condições descritas no ensaio de número 6, utilizando 9,37 mg/mg da proteína espaçadora e 25,5 mM do agente reticulador. Com as concentrações de BSA e GA utilizadas nos ensaios de número 4,7,9,10 e 11 não foi possível recuperar nenhuma atividade lipásica. Baixas recuperações de atividade foram vistas nos ensaios 3,5, e 8 (15,27%, 9,54% e 9,54%) respectivamente. No entanto atividades significativas também foram alcançadas com as condições aplicadas nos ensaios 1 (77,10%) e 2 (65,65%).

Tabela 9 - Atividade da lipase em diferentes concentrações de BSA e Glutaraldeído

Ensaio	BSA (mg/mg)	Glutaraldeído (mM)	Atividade U/mL	Atividade Relativa (%)
1	1.37	8.00	4.58 ± 0.03	77.10
2	8.00	8.00	3.90 ± 0.14	65.65
3	1.37	42.88	0.91 ± 0.03	15.27
4	8.00	42.88	0.00 ± 0.03	0.00
5	0.00	25.50	0.57 ± 0.06	9.54
6	9.37	25.50	5.05 ± 0.13	85.11
7	4.69	1.00	0.00 ± 0.11	0.00
8	4.69	50.00	0.57 ± 0.01	9.54
9	4.69	25.50	0.00 ± 0.34	0.00
10	4.69	25.50	0.00 ± 0.02	0.00
11	4.69	25.50	0.00 ± 0.14	0.00

CLEAs de lipases expressando alta atividade também foram evidenciadas por Guimarães *et al.*, (2018) que obtiveram uma recuperação de atividade em torno de 80%, utilizando a albumina de soro bovino como proteína espaçadora, além de etanol e glutaraldeído como precipitante e reticulante, respectivamente. De acordo Zhu e colaboradores (2021) a imobilização da lipase de *A. niger* pela técnica de CLEAs permitiu uma satisfatória recuperação de atividade ( $99,7 \pm 0,6\%$ ) com o uso tert-butanol como precipitante e 30mM de glutaraldeído como agente reticulador.

Analisando a tabela 9 pode-se perceber que o aumento e a diminuição das variáveis BSA e glutaraldeído exercem influência na recuperação da atividade da lipase. A melhor atividade recuperada foi obtida quando a concentração intermediária estudada (25mM) do glutaraldeído foi adicionada.

Conforme visto na literatura o excesso de glutaraldeído pode afetar a eficiência da

reticulação, grandes quantidades do GA podem reagir com os sítios catalíticos importante da enzima causando uma inativação enzimática, dessa forma a recuperação da atividade pode ser reduzida (REHMAN *et al.*, 2016). Em contrapartida, concentrações muito baixas do desse agente reticulador leva a uma reticulação ineficiente resultando em moléculas livres sem ligação podendo ser lixiviadas (KUMAR *et al.* 2018). Isso pode explicar a ausência e a baixa atividade da lipase vista nos ensaios de número 7 e 8, onde baixas e altas concentrações de glutaraldeído foram empregadas. No ensaio 7 a concentração mais baixa de glutaraldeído 1 mM possivelmente foi insuficiente para reticular adequadamente os agregados da enzima, enquanto que a baixa atividade recuperada no ensaio 8, com a concentração mais alta (50 mM) pode ter sido causada pela inativação induzida por grandes quantidades de glutaraldeído.

Portanto a concentração de glutaraldeído é um parâmetro que deve ser otimizado pois suas grandes quantidades podem se ligar e reagir aos resíduos catalíticos de aminoácidos da enzima de modo que a atividade catalítica dos CLEAs será diminuída (YAMAGUCHI; KIYOTA; MIYAZAKI, 2018). As lipases são enzimas que apresentam poucos grupos amino na superfície podendo diminuir a eficiência da etapa de reticulação (LÓPEZ-GALLEGU; GUIÁN; BETANCOR, 2013) e para solucionar esse problema na reticulação o uso proteínas espaçadoras ricas em grupos aminos são empregados como aditivos com a intenção de melhorar a eficiência da reticulação. A albumina sérica bovina (BSA) e a proteína de soja são exemplos de co-alimentadores proteicos com grandes quantidades de resíduos de grupos aminos e são utilizados na preparação dos CLEAs (MAFRA *et al.*, 2019).

No atual estudo foi investigado o efeito das concentrações do BSA entre 0 e 9,37 mg/mg no rendimento da atividade, o CLEA mais ativo (85,11%) foi preparado com a maior concentração de BSA estudada (9,37 mg/mg), enquanto que o rendimento do CLEA sem adição do BSA foi em torno de 9.54%. Ao utilizar a contração máxima de BSA espaçador aumentou o rendimento da atividade e isso pode estar atrelado ao fato de que essa proteína possui grandes quantidade de grupos aminos de resíduos de lisina em sua superfície permitindo dessa forma que ocorra uma reticulação mais eficiente dos agregados enzimáticos (RAMOS *et al.*, 2018). O alto rendimento de atividade pode estar correlacionado com o fornecimento de grupos aminos livre como a lisina, que interage com o glutaraldeído e dessa maneira evita uma possível desnaturação da lipase (TORRES; FORESTI; FERREIRA, 2013).

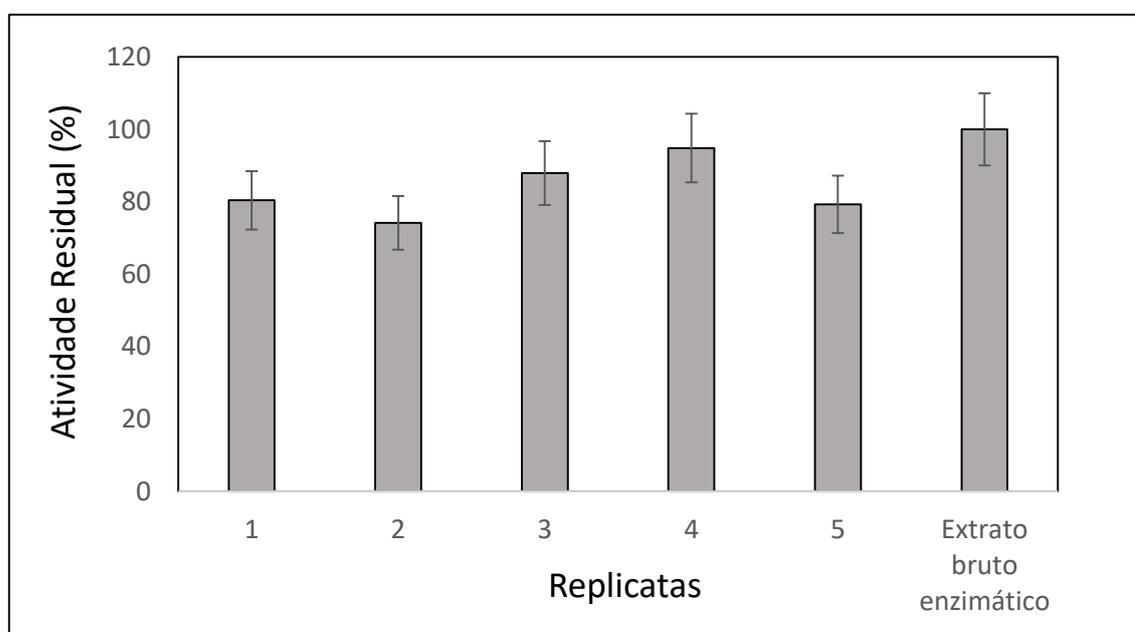
Outros autores apresentaram resultados que corroboram com os obtidos nesse trabalho, demonstrando que o uso do BSA como espaçador proteico pode resolver o problema o baixo teor de lisina das lipases, Jiaojiao *et al.*, (2022) apresentaram uma atividade recuperada de 80% em CLEAs de lipase de *Candida rugosa* após a adição de BSA enquanto que a atividade

recuperada de CLEAs sem BSA foi de 60%. Paitaid *et al.*, (2021) obtiveram a maior atividade recuperada (86,9%) utilizando 6 mg/mL de BSA como alimentador proteico, enquanto que na ausência do BSA a atividade recuperada foi somente de 44,2%. O uso do BSA como alimentador proteico tem sido documentado desempenhando um efeito positivo na preparação de CLEAs de lipases (SAIKA *et al.*, 2021; GUAJARDO *et al.*, 2019; CUI *et al.*, 2016; KHANAHMADI *et al.*, 2015). Com os resultados obtidos neste trabalho e de acordo trabalhos publicados na literatura, pode-se dizer que o uso do BSA exerce efeitos notáveis sobre o processo de reticulação de formação de CLEAs.

Como pode ser visto o rendimento da imobilização por CLEAs depende fortemente de variáveis como natureza do precipitante, concentração do agente reticulador e concentração de proteínas alimentares, para obter bons resultados e garantir uma boa eficiência é indispensável a realização de uma triagem afim de otimizar as melhores condições experimentais.

Então as condições do ensaio 6, foram selecionadas para realização do estudo e foi realizada uma validação dessas condições através de 5 repetições nessas condições. Conforme pode ser observado no Gráfico 4, o coeficiente de variação da quintuplicata foi inferior a 10%, refletindo na baixa dispersão dos dados obtidos das replicatas.

Gráfico 4 - Validação das condições do ensaio 6 para produção dos CLEAs (25mM de glutaraldeído e 9,37 mg de proteína).

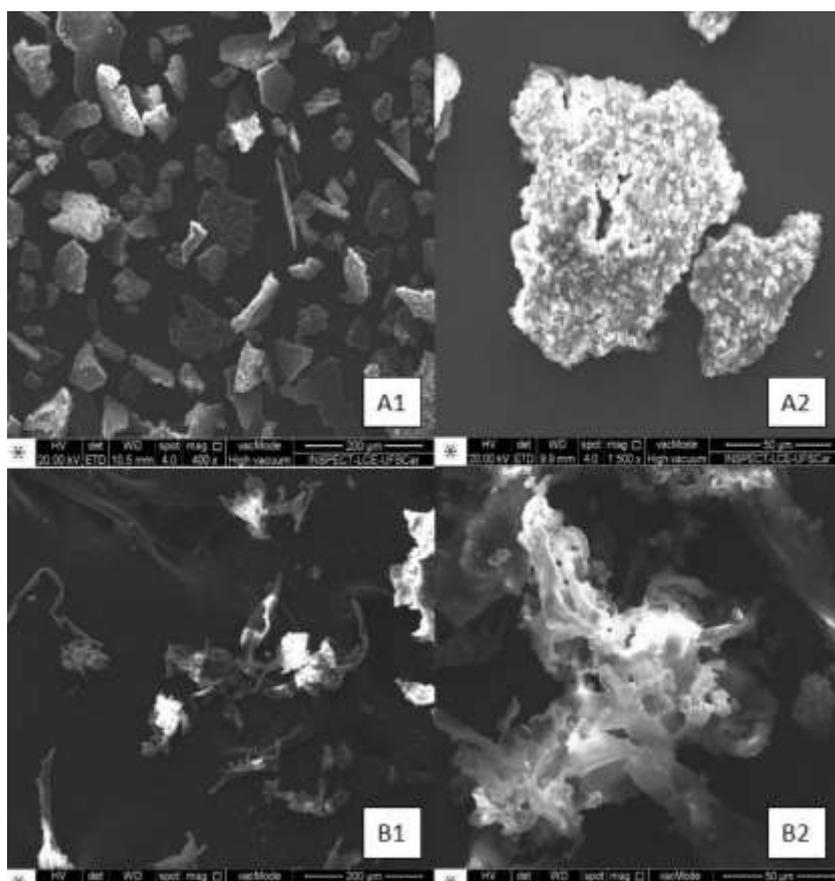


## 2.2.3.4 Caracterização Morfológica

### 2.2.3.4.1 Microscopia eletrônica de varredura

Os agregados de lipase preparados na condição ótima foram caracterizados por análise de microscopia eletrônica de varredura conforme pode-se observar na Figura 5.

Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura da enzima livre e precipitada.



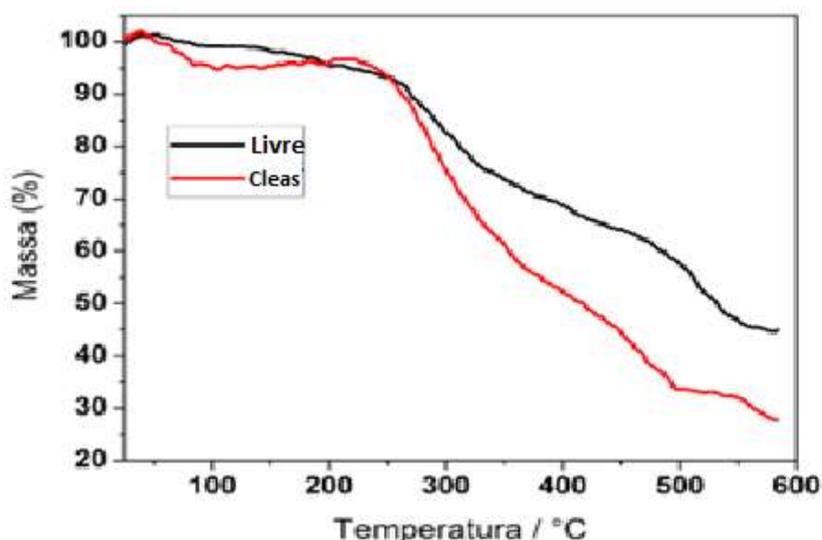
Legenda: Enzima livre precipitada A1 magnitude 400x, e A2 magnitude 1500x e após reticulação, CLEAs B1 magnitude 400x e B2 magnitude 1600 x.

Após observar as imagens, pode-se constatar que houve mudanças na morfologia e aspecto do material após o processo de preparação dos agregados da enzima. Antes do entrecruzamento com o glutaraldeído o material se encontra empacotado em blocos densos por interações interprotéicas (Fig. A1 e A2). Após a reticulação pode-se observar a formação de estruturas menos densa, devido a inserção de cadeias carbônicas que impede a colapso das cadeias proteicas (OKURA *et al.* 2020). Muitos autores sugerem que a morfologia dos CLEAs está relacionada com o modo de preparação, proteína utilizada, com o agente de reticulação selecionado (MIAO *et al.* 2019; CUI *et al.* 2017).

#### 2.2.3.4.2 Análise Termogravimétrica

De acordo com o Gráfico 5, podemos observar que a amostra de CLEAs foi menos estável termicamente do que amostra da enzima livre, à altas temperaturas. A amostra CLEAs apresentou a primeira perda de massa significativa a aproximadamente 325°C, enquanto que para a enzima livre esse processo ocorreu a 380°C. A partir da temperatura de 300°C, a perda de massa foi mais acentuada para os CLEAs durante toda faixa de temperatura analisada. A perda massa apresentada inicialmente pode ser desconsiderada, pois está associada a evaporação de água presente na amostra.

Gráfico 5 - Curvas TGA do derivado (Cleas) e da enzima livre.



Esse comportamento pode ser atribuído à inserção das cadeias carbônicas durante a reticulação pelo glutaraldeído. Então dessa maneira a enzima livre consegue se compactar melhor apresentando maior estabilidade térmica a altas temperaturas, enquanto os CLEAs onde foram inseridas as cadeias carbônicas resultaram em uma estrutura mais porosa e espaçada, e assim menos estável na faixa estudada (OKURA *et al.* 2020). Tal alteração morfológica pode ser observados na microscopia eletrônica de varredura (Figura 5).

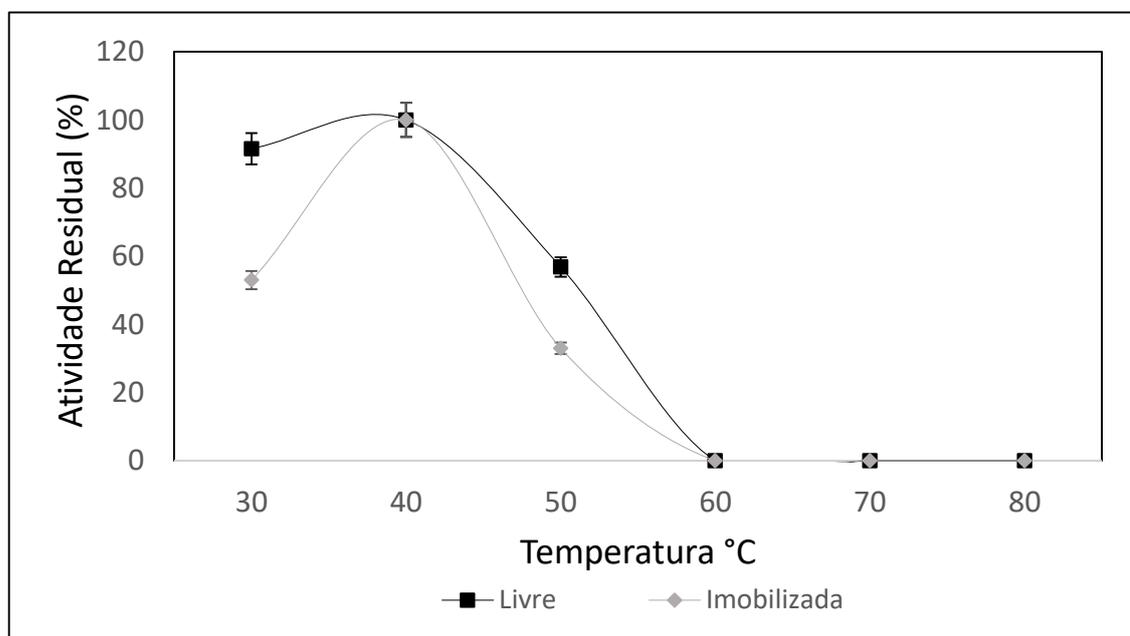
Sanchez *et al.* (2015) relataram que a inserção de grupos funcionais pode causar a redução da compactação efetiva de macromoléculas, mitigando sua estabilidade térmica nessa faixa de temperatura, devido porosidade das estruturas.

### 2.2.3.5 Caracterização bioquímica

#### 2.2.3.5.1 Determinação da temperatura e pH ótimo de atividade

A atividade da lipase livre e imobilizada foi examinada em uma temperatura entre 30° e 80°C. Através do Gráfico 6 podemos perceber um desempenho semelhante para a temperatura ótima em ambas as formas da enzima, sendo a temperatura ótima a 40°C. De acordo com o gráfico, observa-se um declínio abrupto na atividade das enzimas conforme há um aumento de temperatura, sendo que a enzima é completamente desnaturada a partir dos 60°C. Esses resultados podem estar relacionados ao fato de que a atividade catalítica das enzimas é fortemente influenciada pela temperatura, uma elevação nesse parâmetro aumenta a probabilidade de desativação térmica que pode ocorrer devido mudanças conformacionais nas estruturas enzimáticas, bem como pode levar a uma desnaturação da enzima (PACHECO, 2021).

Gráfico 6 - Atividade relativa (%) da lipase livre e imobilizada em diferentes faixas de temperatura.



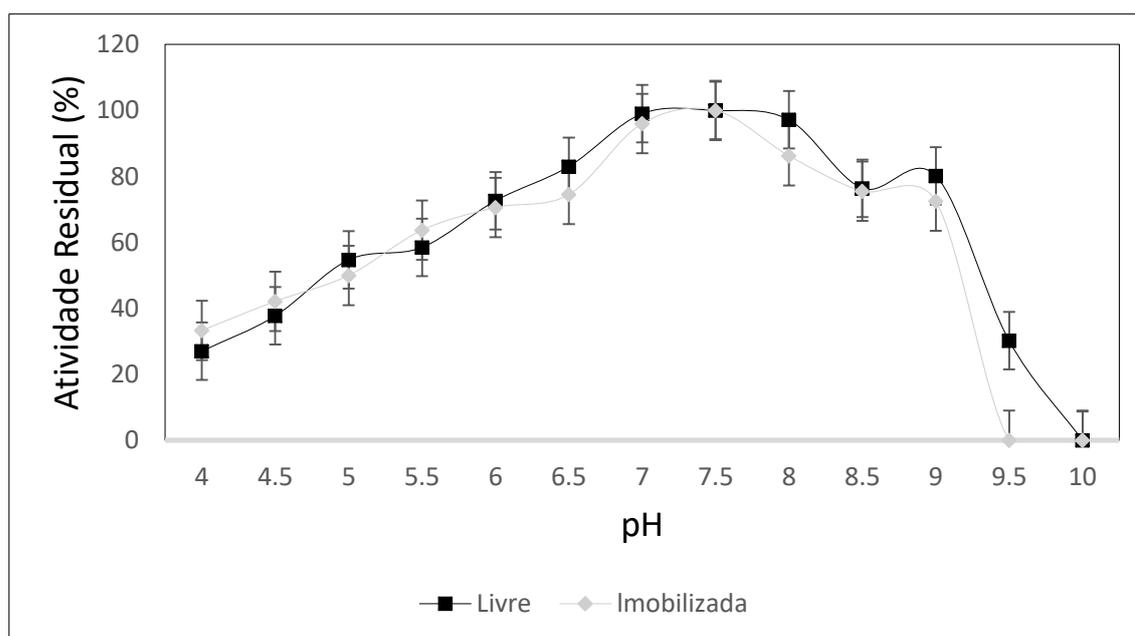
Esses resultados se assemelham aos obtidos por Oliart-Ros *et al.*, (2021) onde a temperatura ideal foi registrada a 40 °C tanto para a enzima solúvel quanto para os CLEAs de lipase, bem como uma diminuição da atividade em resposta a elevação da temperatura. Condições similares de temperatura ótima foram reportadas por Muley *et al.*, (2021) a

temperatura ótima para a enzima na sua forma livre foi de 40°C, e as enzimas imobilizadas por CLEAs registraram a maior atividade a uma temperatura de 45°C. O mesmo comportamento de temperatura ótima para ambas formas da enzima (livre e imobilizada) foram reportadas por Miao *et al.*, (2019) onde a atividade da lipase livre de *Candida antarctica*, dos CLEAs convencionais e p-CLEAs (CLEAs porosos) foram obtidas a uma temperatura ótima de aproximadamente 45°C, com conseqüente declínio de atividade com o aumento da temperatura.

O aumento da temperatura pode resultar em modificações das propriedades físico-químicas da proteína, alterações conformacionais na estrutura física da enzima que acaba resultando na diminuição da especificidade do sítio cataliticamente ativo da enzima (CURVELO *et al.*, 2010 apud EL-GHONEMY *et al.*, 2021). Além disso o comportamento da atividade enzimática age da seguinte maneira, à medida que a temperatura aumenta constata-se um aumento da atividade enzimática devido ao aumento do movimento molecular e da taxa de reação, no entanto concomitantemente a enzima começa a se desnaturar e logo estará inativada (YAVUZ *et al.*, 2017).

O gráfico 07 exibe o perfil da atividade da enzima livre e imobilizada na faixa de pH estudada (4,0 a 10,0). O comportamento da enzima solúvel e imobilizada é bem semelhante no que se refere ao pH ótimo de atividade também, estando esse situado em um pH neutro de 7,5, enquanto meios ácidos e básicos favoreceram menores atividades enzimáticas.

Gráfico 7 - Atividade relativa (%) da lipase livre e imobilizada em diferentes faixas de pH.



Esses resultados foram consistentes aos apresentados por Harini e colaboradores (2021) onde a lipase de *Candida antarctica* na sua forma livre e imobilizada por CLEAs foram submetidas a avaliação do efeito do pH e evidenciado que o pH ótimo de atividade para ambas foi de 7,5. Um pH ótimo neutro (7,0 e 7,5) para a enzima livre e imobilizada também foi evidenciado por Jiaojiao *et al.*, (2022) onde estudaram o melhor desempenho catalítico da lipase imobilizada pela tecnologia de agregados enzimáticos reticulados.

Cada enzima opera em uma variação de pH específica, sendo que suas atividades acabam reduzindo a medida que se afastam do seu pH ideal. Isso ocorre porque os aminoácidos apresentam grupos dissociáveis que são passíveis de sofrer protonação (adição de H) e desprotonação (retirada de H) dependendo do pH em que a solução do aminoácido se encontra. O pH ótimo de cada enzima proporciona o arranjo dos grupos protonados e desprotonados, alterando o estado de ionização de resíduos de aminoácidos da enzima que são essenciais à catálise, favorecendo o melhor desempenho (PACHECO, 2021).

#### 2.2.3.5.2 Determinação da temperatura e pH de estabilidade

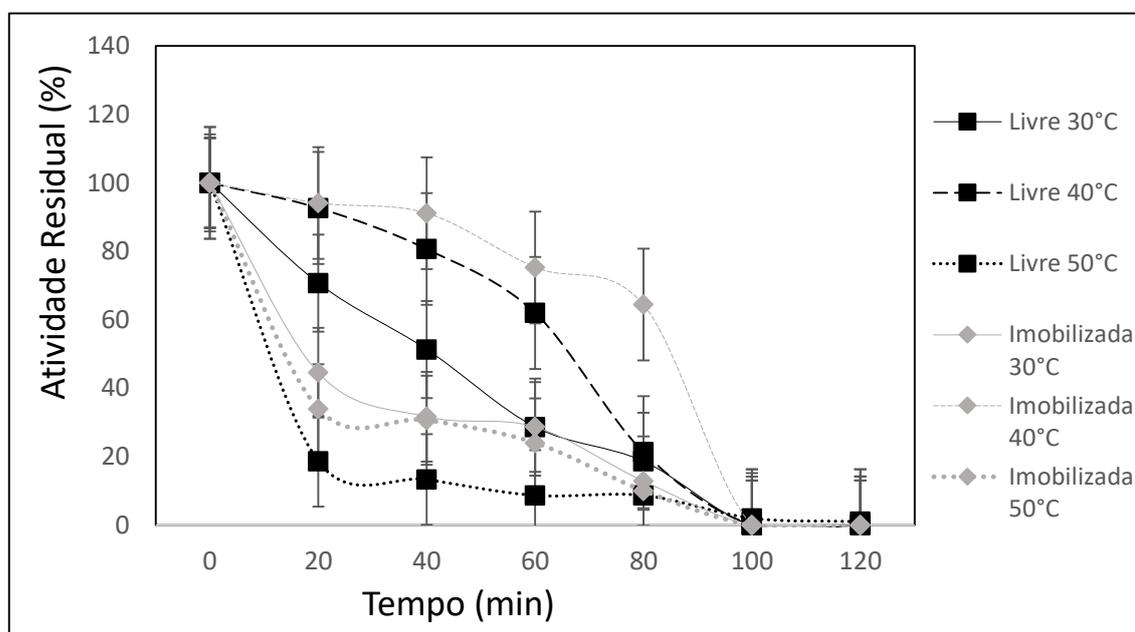
O Gráfico 8 ilustra o perfil de estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada, as alíquotas enzimáticas e os CLEAs foram incubadas por 2 horas e a cada 20 minutos era determinada a atividade enzimática. As atividades da enzima imobilizada e livre diminuíram mediante o tempo de incubação. Na temperatura ótima de atividade (40°C) a enzima imobilizada mostrou-se mais estável durante o período de incubação, mantendo 64% de sua atividade inicial após 80 minutos, enquanto a enzima livre manteve apenas 21% sob a mesma condição. Essa maior termoestabilidade da enzima imobilizada nessas condições pode ser associada a modificação da estrutura enzimática que ocorre após a etapa de reticulação, a enzima diminui a sua flexibilidade conformacional e conseqüentemente aumenta o grau de rigidez das suas moléculas, impedindo dessa maneira sua desnaturação (RAZIB *et al.* 2020).

A temperatura 30°C a lipase na sua forma livre e imobilizada permaneceram estáveis, após 1 hora de incubação a enzima solúvel e a imobilizada reteve 29% da atividade da sua atividade inicial. Entretanto, nessas mesmas condições (1hora) na temperatura de 50°C a enzima livre perdeu 91% da sua atividade, e a imobilizada sofreu uma queda mais pronunciada, perdendo cerca de 76% da sua atividade inicial. Essa redução na atividade residual dos CLEAs pode ser condicionada a limitação de transferência de massa, devido sua estrutura estar fortemente compactada os poros se tornam moderadamente pequenos dificultando dessa maneira a difusão com o substrato limitando a atividade da enzima imobilizada (SHELDON,

2019).

Saikia *et al.*, (2021) encontrou resultados similares ao atual estudo, ao imobilizar a lipase de *Candida antártica* pela técnica de CLEAs evidenciou que a estabilidade térmica da enzima imobilizada era menor que a lipase livre em uma menor temperatura, mas ao elevar esse parâmetro os CaLB imobilizados apresentaram uma maior estabilidade térmica. Guimarães *et al.*, (2018) apresentaram em seu estudo uma alta estabilidade a 40°C das lipases imobilizadas pela técnica de CLEAS, sendo mais estáveis ao longo do tempo quando comparado com a enzima na sua forma livre.

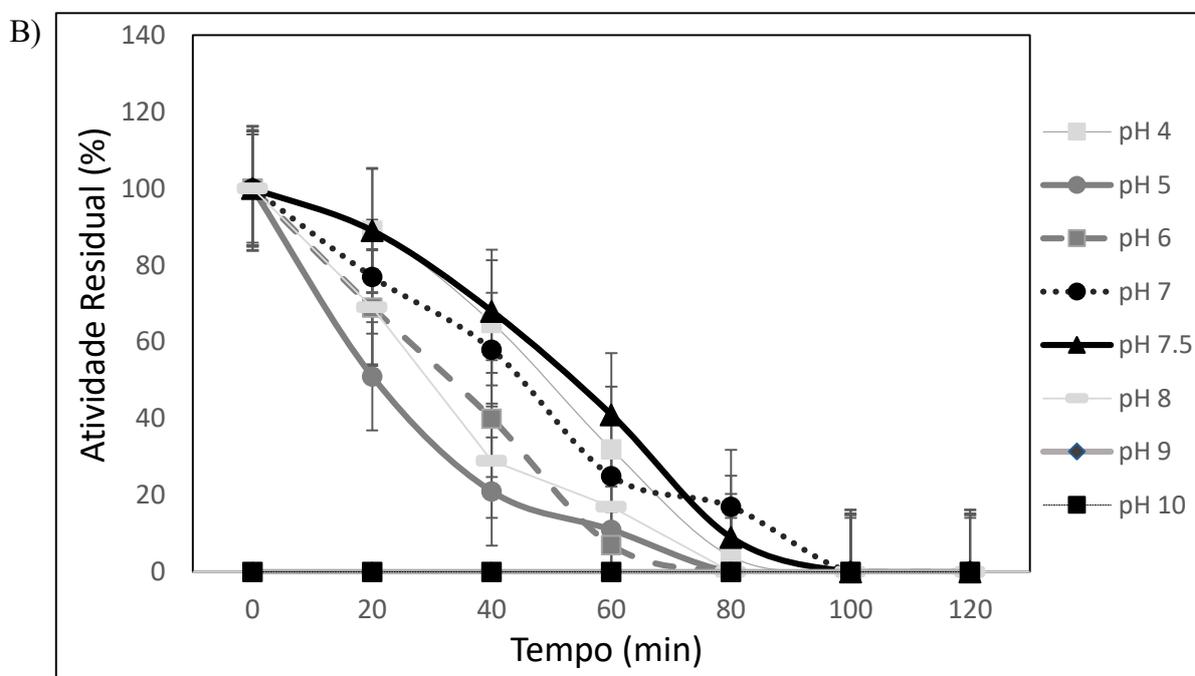
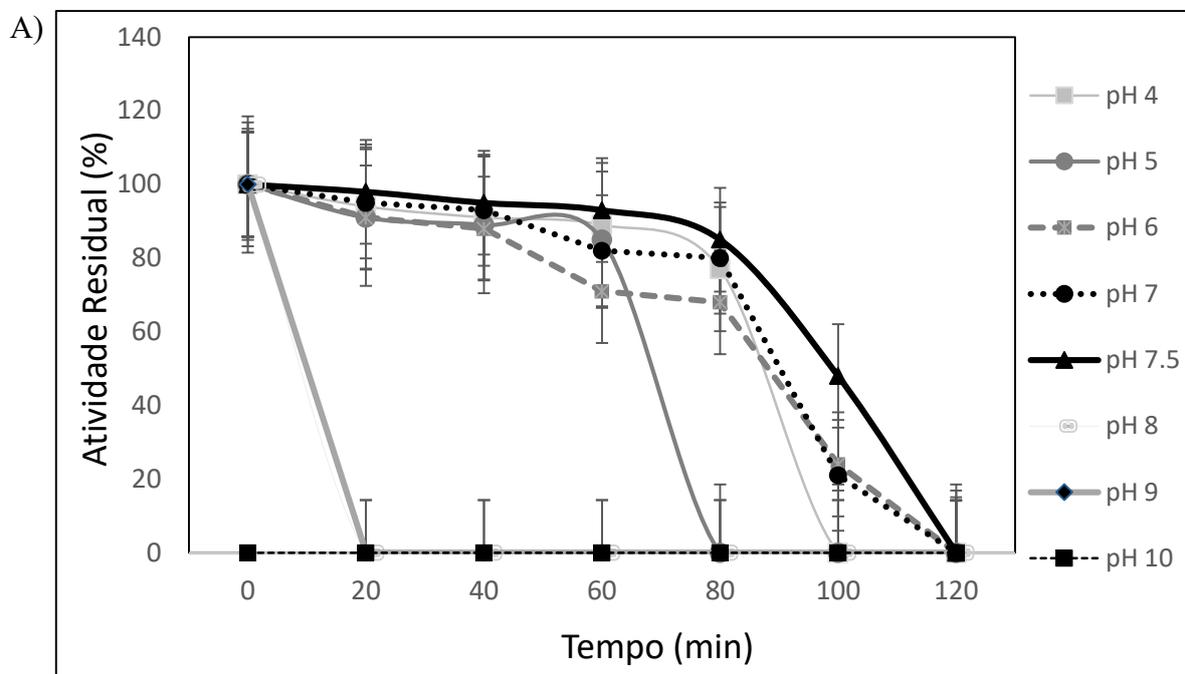
Gráfico 8 - Temperatura de estabilidade da lipase livre e imobilizada em diferentes faixas de temperatura.



A estabilidade da enzima livre e imobilizada foram analisadas frente a uma ampla faixa de pHs (4,0 a 10,0). Com base nos resultados presentes no Gráfico 9 é possível concluir que técnica CLEA melhorou a estabilidade do pH em uma faixa de 4,0 a 7,5. A enzima imobilizada manteve 93% da sua atividade no pH ótimo (7,5) após uma hora de incubação. Em contraste a atividade relativa da lipase livre nas mesmas condições foi 41%. Na maioria dos pHs há registros de atividade da lipase imobilizada com 100 minutos de incubação, enquanto que a enzima livre não apresentou nenhuma atividade a esse período de incubação. Ambas as formas da enzima não se mostraram estáveis em pHs alcalinos, sendo resistentes apenas em condições ácidas. Verificou-se que a lipase livre em pH 5,0 e 6,0 reteve sua atividade em 11 e 7% respectivamente após 1 hora de incubação, em contrapartida a lipase imobilizada nessas mesmas condições manteve 85 e 71% da sua atividade inicial, aumentando a estabilizada da

enzima em mais de seis vezes comparação com a lipase livre em pH semelhante.

Gráfico 9 - pH de estabilidade da lipase imobilizada (A) e livre (B) em diferentes faixas de pH.



A técnica de CLEAs tem a capacidade de melhorar a estabilidade da enzima frente ao pH, isso ocorre presumivelmente devido a estabilização da enzima contra a protonação e desprotonação (RAZIB *et al.*, 2020). Essa melhor estabilidade condicionada aos CLEAs de

lipase pode estar associada a estrutura molecular mais estável causada pelo processo de reticulação promovida pelo glutaraldeído (MIAO *et al.*, 2019).

Outros estudos previamente reportados na literatura também observaram o mesmo comportamento após a imobilização por CLEAs ocorreu o aumento da estabilidade do pH. Em um estudo reportado por JiaoJiao *et al.*, (2022) os agregados enzimáticos reticulados de lipase demonstraram maior estabilidade aos pHs em comparação a enzima solúvel. Os resultados obtidos por El-Ghonemy *et al.*, (2020) também relataram que o processo de imobilização melhorou a estabilidade da enzima lipase em condições neutras e alcalinas. Um estudo desenvolvido por Zhu *et al.*, (2021) demonstrou resultado semelhante ao obtido nesse trabalho, a lipase imobilizada de *A. niger* teve sua estabilidade melhorada em comparação com a enzima livre, além de melhorar a estabilidade, a técnica de CLEAs melhorou a resistência da enzima à condições ácidas. Enzimas com tolerância à ambientes ácidos são bastante interessantes uma vez que se torna benéfico o seu uso em diversas aplicações industriais e em vários ambientes agressivos.

#### 2.2.3.5.3 Parâmetros termodinâmicos

Os perfis cinéticos de inativação da lipase solúvel e imobilizada são mostrados na Tabela 10. Esses parâmetros termodinâmicos são pontos importantes pois fornecem informações sobre o mecanismo de inativação da enzima.

Tabela 10 - Dados cinéticos de inativação térmica de lipase e imobilizada em diferentes valores de temperatura.

Temperatura (°C)	Lipase	R <sup>2</sup>	k <sub>d</sub> (min <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (min)	FE
30	Livre	0,9524	0,0167	41,4	1
	Imobilizada	0,9808	0,0092	59,4	1,44
40	Livre	0,9619	0,0139	48,2	1
	Imobilizada	0,9989	0,0074	65,3	1,37
50	Livre	0,9615	0,0073	10,5	1
	Imobilizada	0,9693	0,0051	19,4	1,85

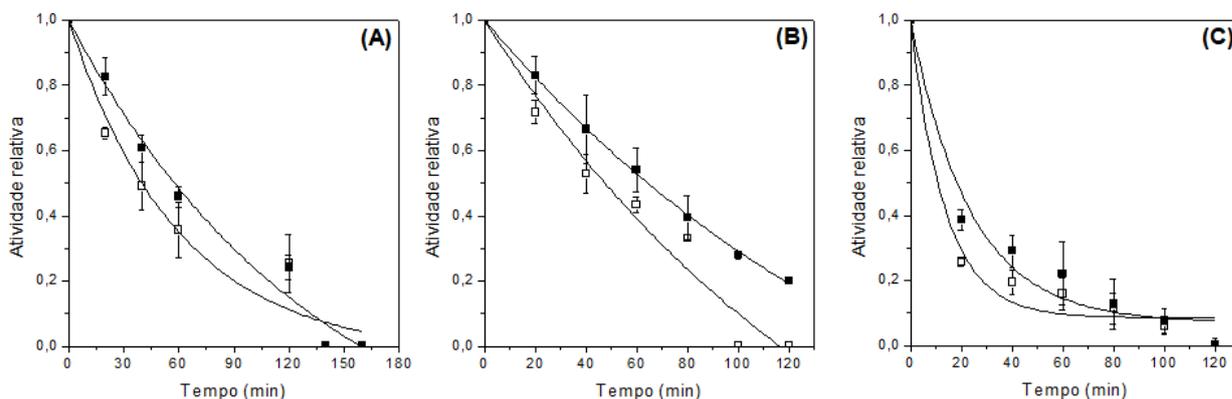
Os valores de constante de inativação térmica (k<sub>d</sub>) e tempo de meia-vida (t<sub>1/2</sub>) dos biocatalisadores foram determinados em diferentes temperaturas de incubação. Para a lipase imobilizada os valores de k<sub>d</sub> variaram entre 0,0092- 0,0051/min, enquanto que a enzima solúvel

os valores foram 0,0167-0,0073/min. Como pode ser observado a taxa de inativação do biocatalisador na forma livre foi maior do que a enzima imobilizada. Quanto menor for o valor da constante de inativação maior é o tempo de meia-vida da enzima e maior será a sua estabilidade (PACHECO, 2021), inversamente maiores valores de  $kd$  estão associados a uma menor termoestabilidade, o comportamento evidenciado neste estudo, demonstra que o tempo de meia-vida da enzima insolúvel (59,4-65,3-19,4 min) foi maior em todas as temperaturas quando comparado com a enzima livre (41,4-48,2,-10,5 min). Esse tempo de meia-vida está relacionado ao tempo necessário que uma enzima leva para que sua atividade enzimática decresça até 50% do valor de sua atividade inicial em uma determinada temperatura. Desta maneira um tempo de meia-vida maior demonstra que a enzima é capaz de suportar a temperatura por um período de tempo maior (SOUZA, *et al.*, 2015). Pode-se inferir desta maneira que o processo de imobilização conferiu estabilidade à enzima.

A imobilização permitiu um aumento da meia-vida da enzima em todas as temperaturas estudadas, um comportamento semelhante, foi relatado por Ferreira *et al.*, 2018, que imobilizou a lipase de *Geotrichum candidum* (GCLI) e o tempo de meia-vida da enzima imobilizada foi maior do que a enzima livre. Uma maior estabilidade da lipase imobilizada com relação a enzima livre também foi reportado Miranda *et al.*, 2014, nesse estudo os valores da constante de inativação ( $kd$ ) foram superiores para a enzima solúvel. Badgular; Bhanage, 2017, utilizaram a lipase de *Candida rugosa* para imobilização via reticulação com glutaraldeído e o tempo de meia-vida apresentado foi substancialmente maior em várias temperaturas do que a enzima livre, e o  $kd$  foi dez vezes menor em comparação com a lipase livre. Essa melhoria na estabilidade térmica pode estar associada ao uso do glutaraldeído que forma as ligações químicas covalentes diretas (ERDEMIR; YILMAZ, 2009 apud BADGUJAR; BHANAGE, 2017).

O fator de estabilidade se resume ao tempo de meia-vida de uma dada enzima antes e após sua imobilização, este parâmetro pode ser utilizado para determinar a eficiência da imobilização (SOCCOL; FRANÇA; RESENDE, 2016). Como pode ser visto na tabela 10 o fator de estabilidade da enzima imobilizada mostra que a estabilidade dessa enzima foi maior na temperatura de 50°C, sustentando o fato de que o processo de imobilização proporciona uma melhor estabilidade a enzima estudada em temperaturas mais altas. Nos gráfico a seguir (10) podemos observar o perfil de inativação térmica da enzima livre e imobilizada em diferentes temperaturas.

Gráfico 10 - Perfis de inativação térmica



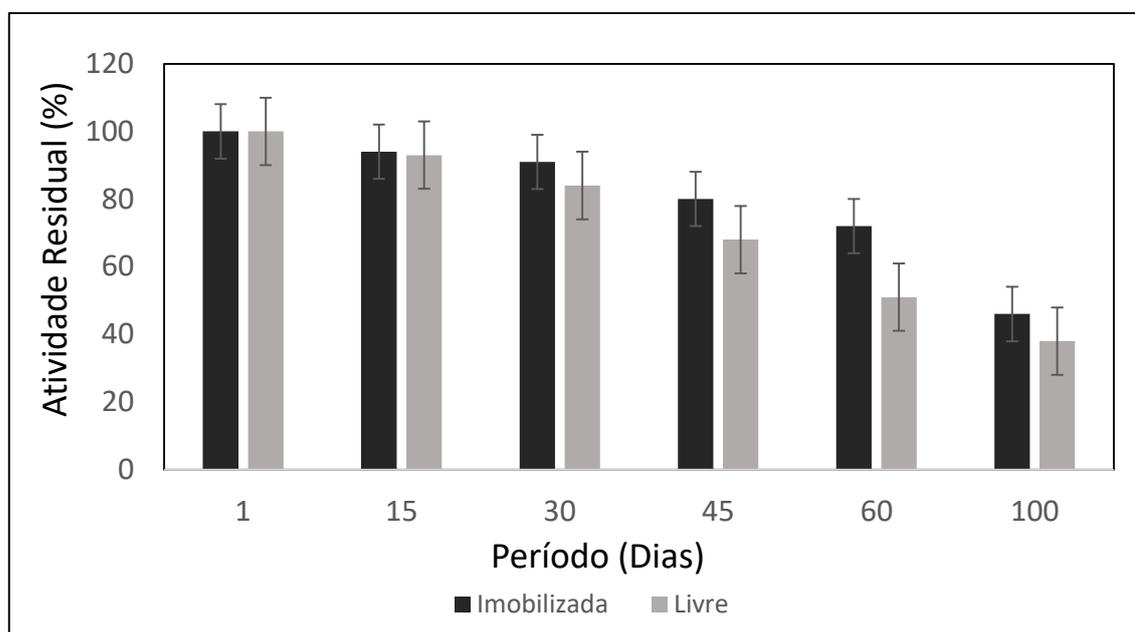
Legenda: lipase livre (□) e imobilizada (■) em pH 7,0 (tampão fosfato de sódio – 100 mM) por incubação nas temperaturas de 30°C (A), 40°C (B) e 50°C (C).

#### 2.2.3.5.4 Estabilidade de armazenamento

Outro fator importante para a aplicação da enzima é a sua estabilidade de armazenamento. Dessa maneira o efeito da técnica CLEA na estabilidade de armazenamento foi realizado e comparado com a enzima na sua forma livre. De acordo as atividades relativas apresentadas no Gráfico 11, observa-se que ambas as formas da enzima há uma tendência decrescente no comportamento da atividade durante o tempo de armazenamento a 4°C. Porém, o decréscimo de atividade foi mais acentuado para a enzima livre, enquanto que a enzima imobilizada manteve uma maior atividade ao longo do tempo.

Após 30 dias de armazenamento a atividade relativa da enzima livre foi de 84% ao mesmo tempo os derivados mantiveram 90% da sua atividade inicial. Quando o tempo de armazenamento foi de 60 dias a lipase imobilizada perdeu 29% da sua atividade, em contrapartida a lipase livre perdeu 49% da sua atividade. Os dados demonstram dessa maneira que a estabilidade de armazenamento sofreu um incremento após a imobilização da enzima pela metodologia de CLEAs.

Gráfico 11 - Atividade relativa (%) da lipase livre e imobilizada de acordo o tempo de armazenamento.



A melhora na estabilidade de armazenamento da lipase imobilizada por CLEAs também foi registrada por autores como Paitaid e Aran (2021), Saika *et al.*, (2021), Zhu *et al.*, (2021). A maior estabilidade enzimática demonstrada pela enzima imobilizada pode estar associada a sua maior resistência a deformação do sítio ativo após a enzima ter sido reticulada pelo glutaraldeído (KULKARNI *et al.*, 2020). Durante a preparação dos CLEAs a formação de ligações covalentes proporciona uma reticulação mais estável de modo que movimento das lipases ficam restringidos o que pode explicar a maior estabilidade de armazenamento das lipases imobilizadas, essa maior estabilidade das lipases imobilizadas é um ponto positivo pois é possível ampliar a aplicação das mesmas na produção industrial (MIAO *et al.*, 2019).

#### 2.2.3.6 Síntese de éster butirato de isoamila

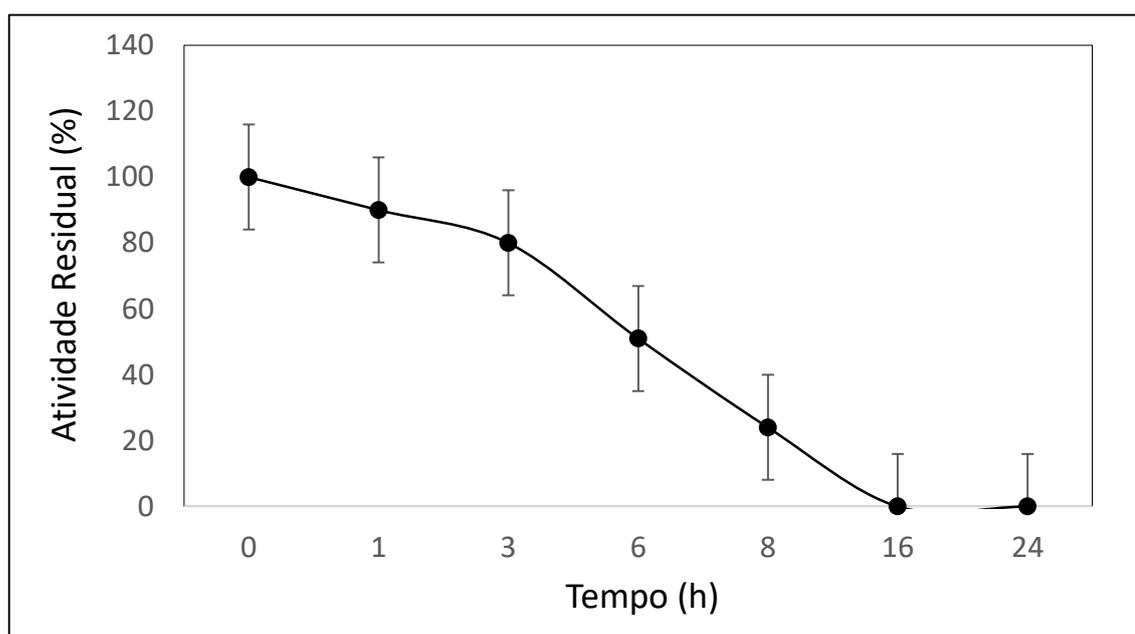
##### 2.2.3.6.1 Estabilidade em solvente orgânico

A estabilidade da enzima em meio contendo solvente orgânico foi avaliada para dar continuidade a próxima etapa do trabalho envolvendo reações de esterificação. A síntese de ésteres mediada pelo uso de enzimas ocorre comumente em meios com a presença de solventes orgânicos e uma mínima quantidade de água na intenção de propiciar a esterificação em detrimento da reação de hidrólise (GUMEL, *et al.*, 2011). Lipases tolerantes a solventes

representam vantagens como aumento da termoestabilidade, facilidade em utilizar substratos imiscíveis em água (PRIYANKA, *et al.*, 2019). Outras vantagens associadas ao uso de enzimas em sistemas de solventes orgânicos, inclui a diminuição da contaminação microbiana, utilização de enzimas diretamente em processos químicos que não são viáveis em meio aquoso (DOUKYU; OGINO 2010).

No Gráfico 12 podemos acompanhar a estabilidade da enzima imobilizada em meio com o solvente heptano durante 24 horas a 40°C. Podemos observar que a enzima permaneceu com 51% da sua atividade inicial após 6 horas de incubação. Ao comparar a estabilidade da enzima em meio aquoso (Gráfico 7) é possível dizer que o uso do solvente melhorou significativamente a estabilidade da enzima imobilizada, uma vez que em condições aquosas a 40°C a enzima foi inativa em menos de duas horas. A melhora da estabilidade frente a temperatura pode estar relacionada ao fato de que a rigidez da enzima pode desempenhar um papel no reforço da termoestabilidade (KALIMERI, *et al.*, 2013), o estado desidratado causado pelo uso de solventes orgânicos levam a uma rigidez conformacional, desta forma a estabilidade da enzima é melhorada (LAPANJE, 1978) essa estabilização conformacional que a enzima sofre em ambientes não-aquosos é conhecida como efeito gaiola, onde as moléculas da enzima dentro da proteína ficam fortemente empacotadas pelas moléculas a sua volta (KHMELNITSKY, *et al* 1988).

Gráfico 12 - Estabilidade da lipase imobilizada em meio contendo heptano.



O aumento da estabilidade da enzima em solventes orgânicos é evidenciado por diversos autores como Min, *et al.*, (2021), que melhoraram a resistência a solventes orgânicos da lipase de *Bacillus subtilis*. Uma alta estabilidade a diversos solventes orgânicos hidrofílicos e hidrofóbicos foi vista em lipases de *Haloferax mediterranei* em um estudo desenvolvido por Akmoussi-Toumi (2018) e colaboradores.

A cinética de inativação da lipase imobilizada em meio com solvente orgânico (Tabela 11) revelou que o tempo de meia-vida foi de 5,1h enquanto que o tempo de meia-vida da enzima insolúvel em meio aquoso foi de 65,3min (aproximadamente 1 hora), isso revela que a enzima em meio com solvente orgânico leva mais tempo para que sua atividade se reduza a metade, desse modo sendo mais estável termicamente.

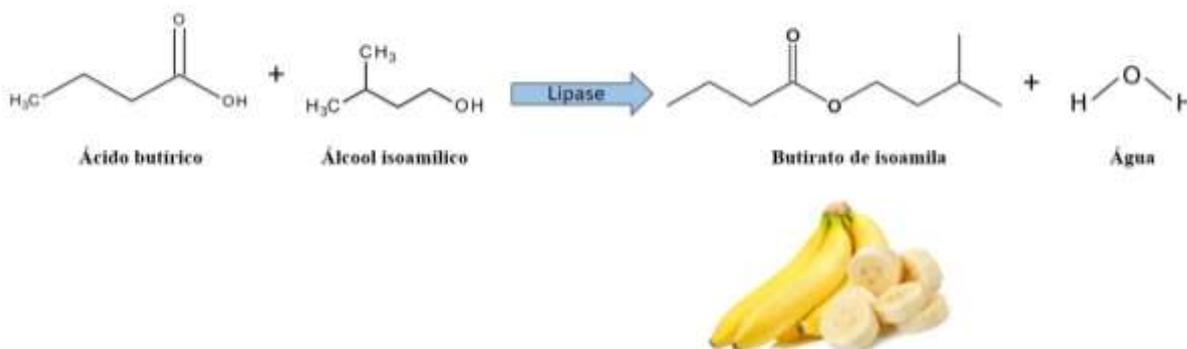
Tabela 11 - Dados cinéticos de inativação térmica de lipase imobilizada a 40 °C em meio de heptano.

Temperatura (°C)	Biocatalisador	R <sup>2</sup>	k <sub>d</sub> (h <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (h)
40	CLEA	0,9586	0,01	5,1

#### 2.2.3.6.2 Esterificação

Nos últimos tempos rotas alternativas aos métodos químicos convencionais para obtenção de ésteres de aroma são objeto de estudos entre pesquisadores e indústrias. As reações de síntese enzimática estão sendo abordadas na intenção de suprir a procura dos consumidores por produtos naturais (COELHO & ORLANDELLI, 2021). Dessa maneira os CLEAs de lipase e a enzima livre foram aplicados em uma reação de esterificação para conversão de ácido butírico e álcool isoamílico em éster butirato de isoamila (odor banana). Um representação do esquema de esterificação e seu produto final pode ser visualizado na Figura 6.

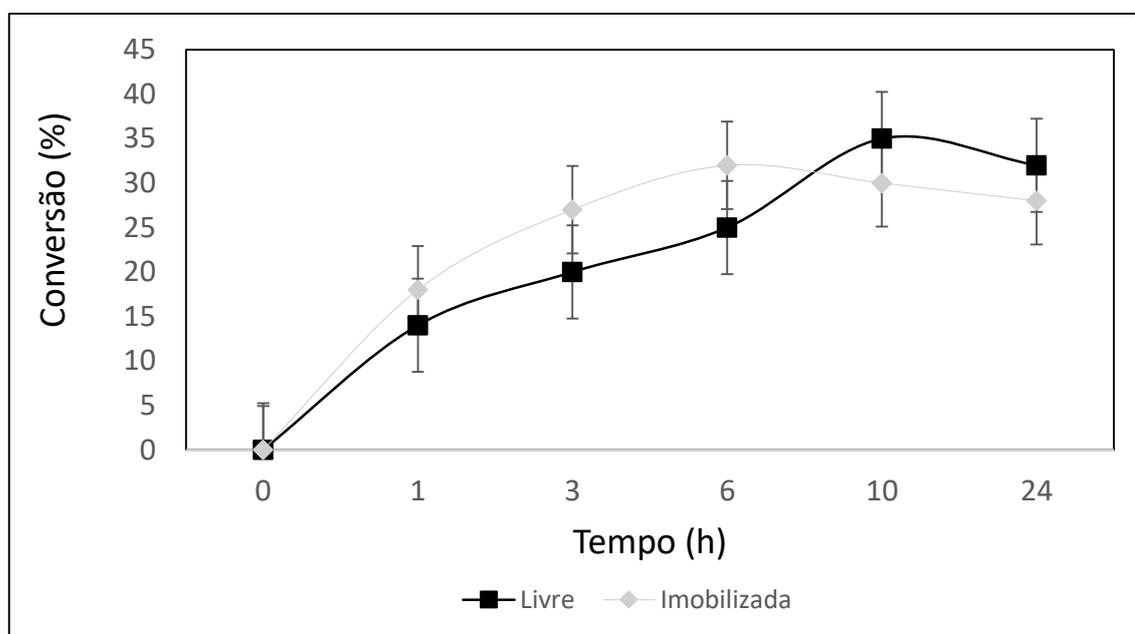
Figura 6 - Esquemática da esterificação do ácido/álcool para conversão do éster.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O Gráfico 13 mostra o comportamento de conversão ácido/álcool mediante o tempo de esterificação. As conversões para o éster estudado aumentaram com o decorrer do tempo, após o tempo ótimo de reação foi observada uma estabilização nas taxas de conversão nos sistemas com a enzima livre e imobilizada. A conversão máxima (35%) para o biocatalisador livre foi alcançada após 10 horas de esterificação, enquanto para a enzima imobilizada a conversão máxima foi de 32% em 6 horas de esterificação.

Gráfico 13 - Síntese de butirato de isoamila em sistema com solvente heptano.



Legenda: Efeito do tempo de reação na produção enzimática de butirato de isoamila por esterificação em meio de heptano catalisada por lipase de *Aspergillus niger* nas formas livre e imobilizada pela técnica CLEA. As reações foram realizadas a 40C, 240 rpm, empregando 5% em massa de biocatalisador, e concentrações equimolares de cada reagente (100 mM de ácido butírico e álcool isoamílico).

Apesar da enzima livre fornecer uma taxa de conversão ligeiramente maior em comparação com a enzima imobilizada, os CLEAs forneceram taxas de conversão similares em um menor tempo de reação, o que é mais vantajoso, uma vez que a obtenção do produto final em menor tempo é um item valorizado pela indústria. Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois as taxas de conversão obtidas foram relevantes principalmente levando em consideração o tempo e a quantidade de enzima (5%) utilizado no ensaio. Essa é uma condição desejável nos processos biocatalíticos em termos de praticidade e economia, bons rendimentos em menor tempo de reação empregando baixas quantidades de biocatalisador (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Os resultados encontrados no presente estudo onde ocorreu a máxima conversão se assemelham aos obtidos por Aragão *et al.*, (2009), que utilizou lipase livre e imobilizada para mediar a síntese de butirato de isoamila. Os autores alcançaram 33% de esterificação com a enzima livre e com a Lipozyme RM IM (imobilizada em resina aniônica) obtiveram 20,9%, no entanto o tempo de reação para a conversão máxima para ambas as formas da enzima em 72 horas de reação. O uso de lipases na síntese de ésteres aromas vem sendo explorado por diversos autores, como na síntese de butirato de isoamila (ANSCHAU *et al.*, 2021), butirato de Cinnamil (WAGHMARE *et al.*, 2017), butirato de benzila (MENESES *et al.*, 2019), butirato de etila e acetato de isoamila (ASMAT *et al.*, 2019).

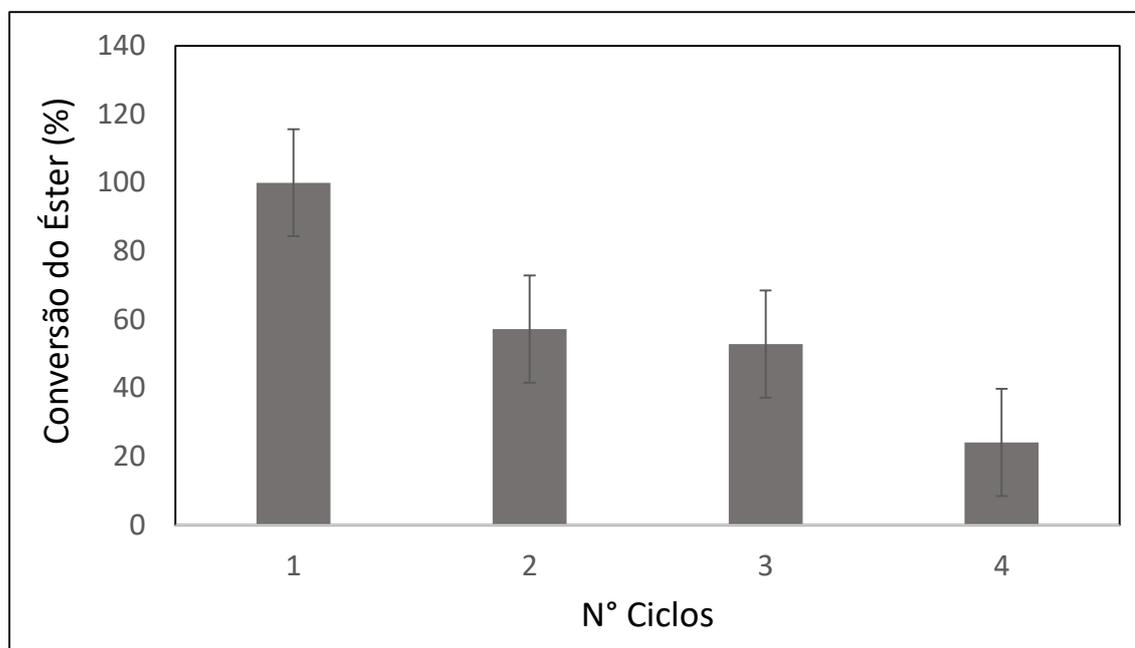
Esses resultados demonstraram que a lipase imobilizada pela metodologia de CLEAs é um bom candidato a catalisar reações de esterificação para obtenção do éster butirato de isoamila. Uma grande vantagem é associada ao uso das enzimas imobilizadas nesses processos, ao utilizar biocatalisadores enzimáticos imobilizados há uma redução dos gastos envolvidos no processo, uma vez que a separação do produto final da enzima é facilitada nessas condições (BAEK *et al.*, 2020).

#### 2.2.3.6.3 Eficiência da reutilização

A possibilidade de reutilizar enzimas imobilizadas é um ponto chave a ser considerado na biocatálise, o reuso confere uma maior produtividade além de minimizar os gastos envolvidos na produção (VASILESCU *et al.*, 2019). Nesse trabalho o biocatalisador foi reciclado na aplicação de síntese de ésteres de butirato de isoamila, após os ciclos os CLEAs foram lavados com hexano, filtrados e reutilizados, até haver uma queda relevante em sua eficiência. Foram realizados quatro ciclos, sendo que no quarto apresentou uma perda de 76% da conversão inicial conforme podemos observar no Gráfico 14. A conversão do éster decaiu

43% após a primeira utilização, e no último ciclo a enzima manteve 24% da sua conversão inicial.

Gráfico 14 - Estabilidade operacional dos CLEAs na síntese de éster butirato de isoamila



#### 2.2.4 Conclusão

Neste trabalho uma metodologia simples e de baixo custo foi utilizada para a imobilização da enzima lipase obtida pelo fungo *Aspergillus niger*, na intenção de obter biocatalisadores economicamente viáveis. Durante a imobilização pela técnica de CLEAs foi possível perceber que alguns parâmetros como natureza do agente precipitante do agente reticulador influenciaram na recuperação da atividade enzimática. A co-agregação da enzima com um co-alimentador rico em grupos amino permitiu uma melhor performance dos agregados enzimáticos reticulados em termos de recuperação de atividade. A enzima imobilizada se mostrou um bom biocatalisador para a síntese do éster butirato de isoamil, uma vez que esse agregado pode ser reutilizado em até 4 ciclos de uso. Em conclusão os CLEAs podem ser considerados como um substituto promissor aos atuais métodos de imobilização para obtenção de biocatalisadores com alta eficiência catalítica e que podem substituir com sucesso o biocatalisadores atualmente disponíveis comercialmente, demonstrando que as lipases imobilizadas detêm propriedades interessantes para muitas aplicações potenciais em setores industriais.

### 2.2.5 Referências

AKMOUSSI-TOUMI, S. *et al.* Kebbouche-Gana purification and characterization of an organic solvent-tolerant and detergent-stable lipase from *Haloferax mediterranei* CNCMM 50101. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 116, p. 817-830, 2018.

ALVES, N. R. PEREIRA, M. M.; GIORDANO, R. L. C. *et al.* Projeto para a preparação de agregados enzimáticos reticulados mais ativos de *Burkholderia cepacia* lipase usando resíduo de fibra de palma. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 44, p. 57–66, 2021.  
<https://doi.org/10.1007/s00449-020-02419-0>

AMARAL-FONSECA, M. *et al.* Preparation of magnetic cross-linked amyloglucosidase aggregates: solving some activity problems. **Catalysts**, v. 8, n. 11, p. 496, Oct. 2018.

ANSCHAU, A. *et al.* Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate from fusel oil". *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 43, p. 54966, Apr. 2021.  
<https://doi.org/10.4025/actascibiols.v43i1.54966>.

ARAGÃO, V. C. *et al.* Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000900005>.

ASMAT, S. *et al.* Immobilization of lipase onto novel constructed polydopamine grafted multiwalled carbon nanotube impregnated with magnetic cobalt and its application in synthesis of fruit flavours. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 484–495, Nov. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.086>.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Investigation of deactivation thermodynamics of lipase immobilized on polymeric carrier. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 40, p. 741–757, 2017.  
<https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00449-017-1740-z>

BARROS, D. P. C. *et al.* Synthetic application and activity of cutinase in an aqueous, miniemulsion model system: hexyl octanoate synthesis. **Catalysis Today**, v. 173, n. 1, p. 95–102, Sept. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2011.05.039>.

BEN AKACHA, N.; MOHAMED GARGOURI. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 675–706, Apr. 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.09.011>.

BILAL, M. *et al.* Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 202–219, Feb. 2019. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1531822>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, May. 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 1, p. 77-84, 2004.

COELHO, A. L. S.; ORLANDELLI, R. C. Immobilized microbial lipases in the food industry: a systematic literature review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 10, p. 1689–1703, May. 2021. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1764489>.

CUI, J. D. *et al.* A facile technique to prepare cross-linked enzyme aggregates of bovine pancreatic lipase using bovine serum albumin as an additive. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 2, p. 610–615, Feb. 2016.

CUI, J. D.; JIA, S. R. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges. **Critical Reviews In Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 15-28, July 2013.

CURVELO S. J. C. *et al.* Optimization of Corn Malt Drying by Use of a Genetic Algorithm. **Drying Technology**, v. 28, n. 11, p. 1236–1244, Nov. 2010.

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical engineering journal**, v. 48, n. 3, p. 270-282, 2010.

EL-GHONEMY, D. H. *et al.* Thermo-alkali-stable lipase from a novel *Aspergillus niger*: statistical optimization, enzyme purification, immobilization and its application in biodiesel production. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 51, n. 3, p. 225-240, 2020.

ERDEMIR, S.; YILMAZ, M. J. Synthesis of calix[n]arene-based silica polymers for lipase immobilization. **J Mol Catal B Enzym**, v. 58, n. 1-4, p. 29–35, 2009.

FACIN, B. R. *et al.* Driving immobilized lipases as biocatalysts: 10 years state of the art and future prospects. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 14, p. 5358–5378, Apr. 2019.

FERRAZ, J. L. A. *et al.* Obtenção de lipases microbianas: uma breve revisão. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 20, n. 1, 2018. <https://doi.org/10.5935/RECEN.2018.01.03>.

FERREIRA, M. M. *et al.* Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 55–63, Apr. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.028>.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. 2011. **Enzimas: Natureza e ação nos alimentos**. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/166.pdf>. Acesso em: 09/06/2022.

GARCIA-GALAN, C. *et al.* Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, p. 2885–2904, 2011.

GUAJARDO, N. *et al.* Remarkable stability of *Candida antarctica* lipase b immobilized via cross-linking aggregates (CLEA) in deep eutectic solvents. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 37, n. 2, p. 106–114, Mar. 2019.

GUEDES, E. *et al.* Resíduos agroindustriais como substrato para a produção de lipases microbiana: uma revisão. **Research, Society And Development**, v. 10, n. 2, p. 1-12, 2021.

GUIMARÃES, J. R. *et al.* Evaluation of strategies to produce highly porous cross-linked aggregates of porcine pancreas lipase with magnetic properties. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2993, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23112993>

GUMEL A. M.; ANNUAR M. S. M.; HEIDELBERG T.; CHISTI Y. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. **Process Biochemistry**. v. 46, n. 11, p. 2079-2090, 2011.

GUPTA, M. N.; RAGHAVA, S. Enzyme stabilization via cross-linked enzyme aggregates. **Enzyme Stabilization and Immobilization**, organizado por Shelley D. Minter, v. 679, p. 133–145, 2011. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-895-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-895-9_11).

HARINI, T. *et al.* Polymer supported cross-linked enzyme aggregates (cleas) of lipase b from *Candida antarctica*: an efficient and recyclable biocatalyst for reactions in both aqueous and organic media. **Biocatalysis and Biotransformation**, p. 1–13, Feb. 2021. <https://doi.org/10.1002/cben.201900016>.

JAIN, R.; NAIK, S. 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, July 2018.

JAVED S. *et al.* Bacterial lipases: a review on purification and characterization. **Prog Biophys Mol Biol**. v. 132, p. 23–34, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>.

JIAOJIAO, X. *et al.* Improved catalytic performance of carrier-free immobilized lipase by advanced cross-linked enzyme aggregates technology. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 45, n. 1, p. 147–158, Jan. 2022.

KALIMERI, M. *et al.* How conformational flexibility stabilizes the hyperthermophilic elongation factor g-domain. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 44, p. 13775-13785, 2013.

KHANAHMADI, S. *et al.* Optimized preparation and characterization of CLEA-Lipase from Cocoa Pod Husk. **Journal of Biotechnology**, v. 202, p. 153–61, May. 2015.

KHMELNITSKY, Y. L. *et al.* Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 12, p. 710-724, 1988.

KULKARNI, N. H. *et al.* Cross-linked enzyme aggregates of arylamidase from *Cupriavidus oxalaticus* ICTDB921: process optimization, characterization, and application for mitigation of acrylamide in industrial wastewater. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 43, n. 3, p. 457-471, 2020.

KUMAR A.; WU, G. B.; LIU, Z. D. Synthesis and characterization of cross linked enzyme aggregates of serine hydroxyl methyltransferase from *Idiomarina leihiensis*. **Int J Biol Macromol**, v. 117, p. 683–690, 2018.

KUMAR, D. S.; RAY, S. Fungal lipase production by solid state fermentation-na overview.

**Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 06, n. 01, p. 1–10, 2014.

LAPANJE, S. *et al.* **Physicochemical aspects of protein denaturation**. Wiley, 1978.

LÓPEZ-GALLEGO F.; GUISÁN J. M.; BETANCOR L. Glutaraldehyde-mediated protein immobilization. in: guisan j. **Immobilization of Enzymes and Cells**, v. 1051, p. 33-41, 2013. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_3)

MACEDO, G. A.; PARK, Y. K.; PASTORE, G. M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 687-692, 1997.

MAFRA, A. C. O. *et al.* Combi-cleas of glucose oxidase and catalase for conversion of glucose to gluconic acid eliminating the hydrogen peroxide to maintain enzyme activity in a bubble column reactor. **Catalysts**, v. 9, n. 8, 2019.

MELANI, N. B. *et al.* Lipases: from production to applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 49, n. 2, p. 143–58, Apr. 2020. <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1564328>.

MENESES, A. C. *et al.* Benzyl butyrate esterification mediated by immobilized lipases: evaluation of batch and fed-batch reactors to overcome lipase-acid deactivation. **Process Biochemistry**, v. 78, p. 50–57, Mar. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.029>.

MIAO, C. *et al.* Synthesis and properties of porous cleas lipase by the calcium carbonate template method and its application in biodiesel production. **RSC Advances**, v. 9, n. 51, p. 29665–29675, 2019.

MIN, K. *et al.* Improving the organic solvent resistance of lipase a from *Bacillus subtilis* in water–ethanol solvent through rational surface engineering. **Bioresource Technology**, v. 337, p. 125394, 2021.

MIRANDA, J.S. *et al.* Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. **Chem Eng J**, v. 251, p. 392–403, Sep. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.087>.

MUKHTAR, H. *et al.* Studies on the lipase production by *Aspergillus niger* through solid state fermentation. **Pakistan Journal Of Botany**, p. 351-354, 2015.

MULEY, A. B. *et al.* Preparation of cross-linked enzyme aggregates of lipase from *Aspergillus niger*: process optimization, characterization, stability, and application for epoxidation of lemongrass oil. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, v. 44, n. 7, p. 1383-1404, 2021.

OKURA, N. S. *et al.* Improved immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on a new chitosan-based heterofunctional support: mixed ion exchange plus hydrophobic interactions". **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 550–561, Nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.021>.

OLIART-ROS, R. M. *et al.* Production and characterization of cross-linked aggregates of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermoalkaliphilic recombinant lipase. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7569, dezembro de 2021.

OLIVEIRA, U. M. F. *et al.* Efficient biotechnological synthesis of flavor esters using a low-cost biocatalyst with immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 1, p. 597–608, Feb. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4514-z>.

PACHECO, T. F. **Guia prático para caracterização de enzimas** / Thályta Fraga Pacheco, Thais Demarchi Mendes. – Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2021.

PAITAI, P.; ARAN, H. K. Enhancing immobilization of *Aspergillus oryzae* st11 lipase on polyacrylonitrile nanofibrous membrane by bovine serum albumin and its application for biodiesel production. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 51, n. 6, p. 536–549, July 2021.

PATEL, H. *et al.* Enhanced lipase production from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* UKHL1 and its application in oily waste-water treatment. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 28, p. 101731, 2020.

PRIYANKA, P. *et al.* Solvent stable microbial lipases: current understanding and biotechnological applications. **Biotechnology Letters**, v. 41, p. 203–220, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-02633-7>

PUTRI, D. N. *et al.* Optimization of *Aspergillus niger* lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. **Energy Reports**, v. 6, p. 331-335, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.egy.2019.08.064>

RAMOS, M. D. *et al.* 1,3-regiospecific ethanolysis of soybean oil catalyzed by crosslinked porcine pancreas lipase aggregates. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 4, p. 910-920, 2018.

RAZIB, M. S. M. *et al.* Biochemical and structural characterization of cross-linked enzyme aggregates (cleas) of organic solvent tolerant protease. **Catalysts**, v. 10, n. 1, p. 55, Jan. 2020. <https://doi.org/10.3390/catal10010055>

REHMAN, S. *et al.* Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Penicillium notatum* lipase enzyme with improved activity, stability and reusability characteristics. **International Journal Of Biological Macromolecules**, p. 1161-1169, 2016.

RMILI, F. *et al.* Purification and Biochemical Characterization of an Organic Solvent-tolerant and Detergent-stable Lipase from *Staphylococcus Capitis*. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 4, July 2019. <https://doi.org/10.1002/btpr.2833>.

RODRIGO, R. R.; SOCCOL, C. R.; FRANÇA, L. R. **Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações** - volume 4, São Paulo: Blucher, 2016. 1069 p.

RODRIGUES, R. C. *et al.* Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746–770, Sep. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>.

ROMANO, I. *et al.* Avaliação da biomassa de fungos amazônicos como fonte de lipases para biocatálise. **Química Nova**, p. 146-154, 2020. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170470>.

SADANA, A.; HENLEY, J. P. Cinética de desativação de enzimas unimoleculares de não primeira ordem de etapa única Biotecnologia. **Bioeng**, v. 30, p. 717-723, 1987.

SAIKIA, K. *et al.* Preparation of highly diffusible porous cross-linked lipase b from *Candida antarctica* conjugates: advances in mass transfer and application in transesterification of 5-hydroxymethylfurfural. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 170, p. 583–592, Feb. 2021.

SALAZAR CARRANZA, L. A. *et al.* Caracterización, clasificación y usos de las enzimas lipasas en la producción industrial. **Rev Cubana Invest Bioméd**, v. 39, n. 4, Dic. 2020.

SÁNCHEZ, R., *et al.* Rheological and tga study of acylated chitosan gel-like dispersions in castor oil: influence of acyl substituent and acylation protocol. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 100, p. 170–178, Aug. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2015.05.022>

SETHI, B. K.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCF 4269.10. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 143-149, Jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.026>.

SHELDON, R. CLEAs, Combi-CLEAs and smart magnetic CLEAs: Biocatalysis in a Bio-Based Economy. **Catalysts**, v. 9, n. 3, p. 261, Mar. 2019.

SHELDON, R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 467-477, Sept. 2011.

SHELDON, R. A. Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEA®s): Stable and Recyclable Biocatalysts". **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 6, p. 1583–1587, Dec. 2007. <https://doi.org/10.1042/BST0351583>.

SHELDON, R. A.; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L. M. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): a novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). **Biocatalysis And Biotransformation**, v. 23, n. 3-4, p. 141-147, Jan. 2005. <http://dx.doi.org/10.1080/10242420500183378>.

SHELDON, R. A.; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L.M. Agregados enzimáticos reticulados (CLEAs): um método novo e versátil para imobilização de enzimas (uma revisão). **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 23, n 3–4, p. 141–147, Jan. 2005. <https://doi.org/10.1080/10242420500183378>.

SILVA, M. B. *et al.* Isolamento de microrganismos e estudo da produção de lipase utilizando resíduos agroindustriais. **Scientia Plena**, v. 12, n. 5, p. 0542141-0542149, 2016. <http://dx.doi.org/10.14808/sci.plena.2016.054214>.

SOUZA, L. T. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In:

Resende, R. R. **Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações**. v. 4. p. 529-568. São Paulo: Editora Blucher, 2017.

SOUZA, L. T. A. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biotecnologia Aplicada À Agro&Indústria**, v. 4, p. 529-568, Jan. 2017. <http://dx.doi.org/10.5151/9788521211150-15>.

SOUZA, P. M. *et al.* Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 17–21, 2015.

SOUZA, P. S. *et al.* Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 4, n. 2, p. 181–188, July 2018. <https://doi.org/10.18540/jcecvl4iss2pp0181-0188>.

SUMATHY, R.; SUMATHY, M.; DEECARAMAN, M. Studies on lipase production from fungal strains by different inducers at varied concentrations -A comparative study. **International Journal Of Environmental Sciences**, v. 3, n. 3, p. 1072-1078, 2012.

THANGARAJ, B.; PRAVIN R. S. Immobilization of lipases – a review. part I: enzyme immobilization”. **ChemBioEng Reviews**, v. 6, n. 5, p. 157–166, Oct. 2019.

TORRES, M. P. G.; FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Effect of different parameters on the hydrolytic activity of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **Biochem. Eng. J.** v. 72, p. 18–23, 2013.

TRBOJEVIĆ IVIĆ, J. *et al.* Design of biocompatible immobilized *Candida rugosa* lipase with potential application in food industry: design of biocompatible immobilized *Candida rugosa* lipase. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 12, p. 4281–4287, setembro de 2016. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7641>.

UTAMI, T. S. *et al.* Production of dry extract extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method to catalyze biodiesel synthesis. **Energy Procedia**, v. 136, p. 41-46, Oct. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2017.10.275>.

VASILESCU, C. *et al.* Enzymatic synthesis of short-chain flavor esters from natural sources using tailored magnetic biocatalysts. **Food Chemistry**, v. 296, p. 1–8, Oct. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.179>.

VETEIKYTÈ, A. *et al.* Sequential application of waste whey as a medium component for *Kluyveromyces lactis* cultivation and a co-feeder for lipase immobilization by CLEA method. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 101, n. 9, p. 3617-3626, 2017.

WAGHMARE, G. V. *et al.* Kinetics of enzymatic synthesis of cinnamyl butyrate by immobilized lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 3, p. 792–806, Nov. 2017. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2464-x>.

WAHAB, R. A. *et al.* On the taught new tricks of enzymes immobilization: an all-inclusive overview. **Reactive and Functional Polymers**, v. 152, p. 104613, July 2020. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104613>.

XU, M. Q. *et al.* Combined cross-linked enzyme aggregates as biocatalysts. **Catalysts**, v. 8, n. 10, 2018.

YAMAGUCHI, H.; KIYOTA, Y.; MIYAZAKI, M. Techniques for preparation of cross-linked enzyme aggregates and their applications in bioconversions. **Catalysts**, v. 8, n. 5, p. 174, 2018.

YANG, H.; ZHANG, W. Surfactant imprinting hyperactivated immobilized lipase as efficient biocatalyst for biodiesel production from waste cooking oil. **Catalysts**, v. 9, n. 11, 2019.

YAVUZ, S. *et al.* Production, purification, and characterization of metalloprotease from *Candida kefyr* 41 PSB". **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 106–113, Jan. 2017.

ZHANG, W. *et al.* Improved performance of magnetic cross-linked lipase aggregates by interfacial activation: a robust and magnetically recyclable biocatalyst for transesterification of jatropha oil. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 1-16, 2017.

ZHU, R. *et al.* Effect of cross-linked enzyme aggregate strategy on characterization of sn-1,3 extracellular lipase from *Aspergillus niger* GZUF36. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 105, p. 1925-1941, 2021.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados apresentados ao longo do trabalho, pode-se concluir que os objetivos inicialmente propostos foram alcançados. Através do processo fermentativo em estado semissólido foi possível produzir e obter bons rendimentos enzimáticos. A proposta de planejamento experimental apesar de não ter sido possível concluí-la serviu como suporte para fazer inferências sobre as variáveis estudadas, e com isso foi possível determinar um ponto ideal de condições a serem utilizadas na produção dos CLEAs. A imobilização pela metodologia que CLEAs seguiu com êxito, uma vez que altas atividades foram recuperadas, e permitiu que a enzima se tornasse mais estável frente a determinados parâmetros. A lipase imobilizada ainda se mostrou um bom biocatalisador na reação de esterificação com finalidade de sintetizar o éster flavorizante. Um dos principais motivos pelo qual é realizada a imobilização é a sua capacidade em permitir a reutilização da enzima, esse objetivo no trabalho foi atingido uma vez que a enzima foi utilizada por quatro ciclos consecutivos. Estudos futuros podem se propor a estudar a utilização de outras combinação de nutrientes na solução nutritiva para a otimização da produção enzimática, avaliar o uso de outros agentes reticuladores em substituição ao glutaraldeído, otimizar as condições de esterificação, bem como usar produtos naturais como óleos para serem os precursores dos ésteres flavorizantes e realizar análises cromatográficas dos produtos obtidos da esterificação. Em suma de maneira geral a contribuição deste trabalho foi o desenvolvimento de um biocatalisador imobilizado que, poderá possivelmente substituir, os processos químicos convencionais em aplicações industriais.

## REFERÊNCIAS

- BOSE, A.; KEHARIA, H. Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 255–266, July 2013.
- CHANDRA, P. *et al.* Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 169, Dec. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>.
- FACIN, B. R. *et al.* Driving immobilized lipases as biocatalysts: 10 years state of the art and future prospects. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 14, p. 5358–5378, Apr. 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b00448>.
- FENG, Y. *et al.* Three-dimensional ordered magnetic macroporous metal-organic frameworks for enzyme immobilization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 590, p. 436–445, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.01.078>.
- GAMAYUROVA, V. S. *et al.* Lipases in esterification reactions: a review. **Catalysis in Industry**, v. 13, n. 1, p. 58–72, Jan. 2021. <https://doi.org/10.1134/S2070050421010025>.
- GUEDES, E. H. S. *et al.* Resíduos agroindustriais como substrato para a produção de lipases microbiana: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e30710212537 Feb. 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12537>.
- MARKEST AND AMRKETES. Industrial Enzymes Market by Type (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases), Application (Food & Beverages, Bioethanol, Feed, Detergents, Wastewater, Soil, and Oil Treatment), Source, Formulation and Region - Global Forecast to 2026. Janeiro 2022. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>.
- MEHTA, A. *et al.* The Lipases and their applications with emphasis on food industry. **Microbial Biotechnology in Food and Health**, p. 143–164, 2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819813-1.00006-2>.
- NGUYEN, H. H.; KIM, M. An overview of techniques in enzyme immobilization. **Applied Science and Convergence Technology**, v. 26, n. 6, p. 157–163, 2017.
- PHUKON, L. C. *et al.* Production and characterisation of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6. **Bioresource Technology**, v. 309, p. 123352, Aug. 2020.
- RIGO, D. *et al.* Produção microbiológica de enzimas: uma revisão/microbiological production of enzymes: a review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9232–9254. 2021, <https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-624>.
- SOUZA, L. T. A. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. *In*: RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R.; FRANÇA, L. R. **Biociência aplicada à agro&indústria**, São Paulo: Blucher, 2017. v. 4. p. 529-568.