

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

MARIA VICTORIA CRUZ FAVARO VIEIRA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES UTILIZANDO ÓLEO DE *Passiflora
edulis***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

APUCARANA – PR

2019

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

MARIA VICTORIA CRUZ FAVARO VIEIRA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES UTILIZANDO ÓLEO DE *Passiflora
edulis***

Trabalho de Conclusão de Curso, de Graduação, apresentado ao curso superior de Licenciatura em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Apucarana, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado(a) em Química.

Orientadora: Prof.^a. Dr^a Milena Martins Andrade.

APUCARANA – PR

2019



Ministério da Educação
**Universidade Tecnológica Federal do
Paraná**
Campus Apucarana
COLIQ – Coordenação do Curso
Superior de Licenciatura em Química



TERMO DE APROVAÇÃO

Otimização d produção de lipases utilizando óleo de *Passiflora edulis*

por

Maria Victória Cruz Favaro Vieira

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado aos 29 dias do mês de novembro do ano de 2019, às 15 horas, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado(a) em Química, linha de pesquisa Biomateriais e Biocatálise, do Curso Superior de Licenciatura em Química da UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela banca examinadora composta pelos professores/servidores abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof.^a Dr.^a Milena Martins Andrade – ORIENTADORA

Prof.^a Dr.^a Lilian Tartiani Dusman Tonin – EXAMINADOR

Prof.^a Dr.^a Rúbia Michele Suzuki – EXAMINADOR

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, que me conduziu ao melhor caminho quando situações difíceis não pareciam ter solução.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Milena Andrade Martins por toda a paciência, dedicação e companheirismo durante todo o trabalho.

Aos meus pais, Celi e Gustavo, que sempre me iluminaram e me deram forças para trabalhar sempre por meus objetivos, por confiarem em mim e se dedicarem tanto.

Aos meus irmãos João Victor e Luisa, por todo amor e carinho.

As minhas avós, Benedita e Yone, por estarem presentes em todos os momentos de minha vida.

Ao meu padrasto, Jayme, por todo esforço feito por mim e por ser tão presente em nossa família.

RESUMO

VIEIRA, M. V. C. Otimização da produção de lipases utilizando óleo de *Passiflora edulis*. 2019. 34 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2019.

Como uma alternativa ecológica aos processos químicos são utilizadas enzimas em indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxteis, entre outras. As lipases são enzimas de grande interesse industrial, pois catalisam diversas reações como hidrólise, transesterificação, esterificação, entre outras. Essas enzimas são produzidas por plantas, animais e micro-organismos como fungos. Nove isolados do gênero *Botryosphaeria* foram estudados e o fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi o melhor produtor de lipases, cultivados em diferentes óleos vegetais e glicerol. O tipo de nutriente utilizado e a concentração afeta diretamente a produção de enzimas. Fontes lipídicas são importantes indutores na produção de lipases. Resíduos agroindustriais como sementes de maracujá podem servir como substratos para a produção de lipases devido a grande disponibilidade e comercialização deste fruto. Assim, o objetivo deste trabalho foi reaproveitar esses resíduos para produzir lipases por *B. ribis* EC-01 utilizando a semente e o óleo extraído das sementes de maracujá. Dois meios fermentativos foram avaliados, um contendo Meio mínimo de sais de Vogel (MMSV) e outro somente água. Planejamentos fatoriais 2^3 com triplicata no ponto central (17 experimentos) foram desenvolvidos para otimizar a produção desta enzima utilizando óleo de *Passiflora edulis* (0,5 a 1,5 %, m/v), glicerol PA (1,3 a 4,7 %, m/v) e sementes de maracujá (0,5 a 5 %, m/v). As respostas avaliadas foram a atividade volumétrica (U/mL) e a atividade por grama de substrato seco (U/gss). A adição de MMSV não foi favorável para a produção desta enzima. A condição ótima em meio aquoso predita foi 30 U/mL quando as concentrações de semente e óleo foram de 3,8 % (m/v) e 0,6 % (m/v), respectivamente. Neste modelo o glicerol exerceu influência negativa na produção. Enquanto que a produção em U/gss predita foi de 924 U/gss, quando semente, glicerol e óleo foram de 3 % (m/v), 1,87 % (m/v) e 0,9 % (m/v), respectivamente. O presente trabalho demonstrou que as sementes e o óleo extraído das sementes de *P. edulis* são viáveis como nutrientes para a produção de lipases por *B. ribis* EC-01 sob condição de fermentação submersa. Este estudo agrega valor a estes resíduos, como também propõe uma maneira econômica de produzir lipases por este fungo.

Palavras-chave: Enzimas. Fermentação Submersa. Resíduos agroindustriais. *Botryosphaeria ribis* EC-01.

ABSTRACT

VIEIRA, M. V. C. Otimização da produção de lipases utilizando óleo de *Passiflora edulis*. 2019. 34 f. Optimization of lipase production using *Passiflora edulis* oil. (Chemistry Graduation), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2019.

As an ecological alternative to chemical processes, enzymes are used in food, pharmaceutical, textile, among others. Lipases are enzymes of great industrial interest, as they catalyze various reactions such as hydrolysis, transesterification, esterification, among others. These enzymes are produced by plants, animals and microorganisms as fungi. Nine isolates of the genus *Botryosphaeria* were studied and *Botryosphaeria ribis* EC-01 was the best lipases producer, grown in different vegetable oils and glycerol. The type of nutrient and concentration used affect directly enzyme production. Lipid sources are important inducers in lipase production. Agroindustrial residues such as passion fruit seeds can serve as substrates for lipase production due to the large availability and commercialization of this fruit. Thus, the objective of this work was to reuse these residues to produce lipases by *B. ribis* EC-01 using the seed and oil extracted from the passion fruit seeds. Two fermentative media were evaluated, one containing Vogel Salts Minimum Medium (VSMM) and the other just water. Factorial designs 2^3 with triplicate at center point (17 experiments) were developed to optimize the production of this enzyme using *Passiflora edulis* oil (0.5 to 1.5%, w/v), glycerol AG (1.3 to 4, 7%, w/v) and passion fruit seeds (0.5 to 5%, w/v). The responses evaluated were volumetric activity (U/mL) and activity per gram of dry substrate (U/gss). The addition of VSMM not favorable for this enzyme production. The predicted optimal condition was 30 U/mL when seed and oil concentrations were 3.8% (w/v) and 0.6% (w/v), respectively. In this model glycerol had a negative influence on production. While the predicted U/gss yield was 924 U/gss, when seed, glycerol and oil were 3% (w/v), 1.87% (w/v) and 0.9% (w/v), respectively. The present work demonstrated that the seeds and oil extracted from *P. edulis* seeds are viable as nutrients for lipase production by *B. ribis* EC-01 under submerged fermentation condition. This study adds value to these residues, as well as proposes an economical way to produce lipases by this fungus.

Keywords: Enzymes. Submerged Fermentation. Agroindustrial waste. *Botryosphaeria ribis* EC-01.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fontes lipídicas na produção de lipases por fermentação submersa	7
Tabela 2 - Meio BDA (Batata Dextrose Agar)	9
Tabela 3 - Meio mínimo de sais de Vogel*	9
Tabela 4 - Níveis de variação para os fatores dos planejamentos fatoriais 23 adicionado de pontos axiais e centrais para avaliação da produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 por fermentação submersa com ou sem adição de meio mínimo de sais de Vogel	13
Tabela 5 - Planejamento fatorial para produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 por fermentação submersa com adição de meio mínimo de sais de Vogel	16
Tabela 6 - Planejamento fatorial para produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 por fermentação submersa sem adição de meio mínimo de sais de Vogel	17
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial 23 para a produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 por fermentação submersa sem adição de meio mínimo de sais de Vogel (U/mL)	18
Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial 23 para a produção de lipase por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 por fermentação submersa sem adição de meio mínimo de sais de Vogel (U/gss)	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reações catalisadas por lipases	4
Figura 2 - Placas contendo o meio de cultivo BDA.....	11
Figura 3 - <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 crescido no meio BDA após 5 dias a 28 ± 2 °C	11
Figura 4 - Meio fermentativo composto por óleo de <i>Passiflora edulis</i> ,glicerol, sementes de maracujá	12
Figura 5 - Esferas de 0,7 cm de diâmetro do micro-organismos crescido sendo cortadas para inocular o meio fermentativo.....	12
Figura 6 - Superfície de resposta para a produção de lipases por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 por fermentação submersa sem adição de meio mínimo de sais de Vogel (U/mL).....	18
Figura 7 - Superfície de resposta para a produção de lipases por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 por fermentação submersa sem adição de meio mínimo de sais de Vogel (U/gss)	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	2
	2.1 OBJETIVO GERAL.....	2
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3	REFERENCIAL TEÓRICO	3
	3.1 LIPASES.....	3
	3.2 PRODUÇÃO DE LIPASES	5
	3.3 <i>Boptryosphaeria ribis</i> EC-01 COMO PRODUTOR DE LIPASE.....	5
	3.4 ÓLEOS E TORTAS VEGETAIS COMO SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE LIPASES	6
	3.5 MARACUJÁ – AMARELO – <i>Passiflora edulis</i>	8
4	MATERIAIS E MÉTODOS	9
	4.1 MATERIAIS	9
	4.1.1 Meios de cultivo.....	9
	4.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	10
	4.2.1 Amostragem e preparo das sementes	10
	4.2.2 Extração de lipídios totais	10
	4.2.3 Produção de inóculo e obtenção de lipases	10
	4.2.4 Determinação da atividade de lipase	13
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
6	CONCLUSÕES	22
	REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

Toneladas de resíduos agroindustriais são descartados como se não tivessem nenhuma função, porém eles possuem inúmeros nutrientes e possibilitam um meio de obtenção de enzimas microbianas. É necessária uma boa destinação a estes resíduos, podendo ser utilizados como substratos para a produção de lipases.

O uso de enzimas nas indústrias permite um desenvolvimento de processos tecnológicos tão eficientes quanto aos realizados pela natureza, de maneira não prejudicial (BARBOSA et al., 2011).

A lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que se caracterizam por hidrolisarem acilgliceróis de cadeia longa e são produzidas por plantas, mamíferos e micro-organismos (bactérias e fungos). Essas enzimas são de ótimo proveito por poderem ser utilizadas nas indústrias de detergentes, medicamentos, alimentos têxteis, polpa e papel, curtumes, cosméticos, biodiesel, e também no tratamento de efluentes. Os fungos produzem enzimas extracelulares, facilitando a recuperação destas que são produzidas principalmente por fermentação submersa (FSM) (SHARMA et al., 2001). É vantajoso usá-los por não serem nocivas à saúde humana e serem bons produtores de lipases.

Fontes lipídicas são conhecidas por induzir a produção de lipases (MESSIAS et al., 2011). Ao cultivar separadamente diversos isolados do gênero *Botryosphaeria* em óleos vegetais diferentes e glicerol, o *B. ribis* EC-01 foi destaque como produtor de lipase nos óleos avaliados (soja e milho) e glicerol (MESSIAS et al., 2009).

Toneladas de resíduos agroindustriais são descartados, porém nos mesmos contém substratos que constituem fontes econômicas de produção de enzimas por possuir em sua composição carbono, nitrogênio e outros elementos. O maracujá-amarelo possui inúmeros nutrientes, sendo o Brasil é o maior produtor mundial da fruta e em seu processamento cerca de 40% do peso do fruto são cascas e sementes que não são aproveitados. As sementes contém grande quantidade de óleo que pode ser utilizado como indutor na produção de lipases. Neste sentido, este trabalho tem como objetivo produzir lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 utilizando como substrato o óleo e a semente de *Passiflora edulis* extraído de sementes de maracujá. Pretende-se desta forma, propor uma forma econômica e sustentável de produção desta enzima.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir lipases pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 utilizando como substrato sementes e óleo extraído de sementes de maracujá (*Passiflora edulis*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Extrair o óleo das sementes de maracujá pelo método de extração de Bligh & Dyer modificado;
- II. Utilizar o óleo extraído das sementes na produção de lipases por fermentação submersa com auxílio de planejamentos fatoriais;
- III. Utilizar as sementes de maracujá na produção de lipases por fermentação submersa com auxílio de planejamentos fatoriais;
- IV. Determinar a atividade enzimática de lipase;
- V. Determinar as condições ótimas de produção desta enzima.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 LIPASES

Lipases são consideradas catalisadores da natureza, as enzimas são polímeros de aminoácidos que catalisam reações de quebra ou junção de moléculas. São altamente específicas e por isso utilizadas em muitos processos tecnológicos. Esses catalisadores requerem condições brandas de temperatura e pressão para atuarem e não causam danos a natureza (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

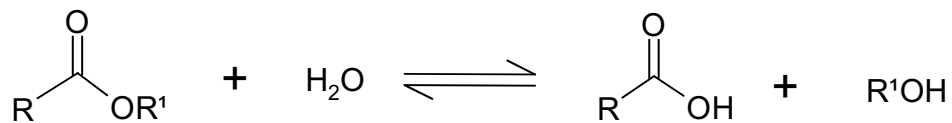
As lipases (EC 3.1.1.3) são definidas como triacilglicerol acil-hidrolases, pois hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila constituída por mais de 10 átomos de carbono (JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; JAEGER; EGGERT, 2002). São originadas a partir de um grande número de bactérias, fungos, plantas e animais, e suas procedências variam de acordo com suas propriedades (Saxena et al., 2003). Sendo a produção de enzimas microbianas mais estável que as extraídas de animais e plantas.

Normalmente as lipases não requerem cofatores, além de serem relativamente estáveis a temperaturas altas e atuam em uma ampla faixa de pH (PANDEY et al., 1999). Estas enzimas pertencem a um grupo de grande interesse tecnológico e são produzidas por plantas, mamíferos e micro-organismos, entre eles bactérias e fungos (SHARMA et al., 2001). As lipases microbianas são produzidas principalmente por fermentação submersa (SmF) em um meio nutriente complexo influenciado pela concentração de nutrientes como fontes de carbono (C) e nitrogênio (N), pH e temperatura (MEHTA; BODH; GUPATA, 2017).

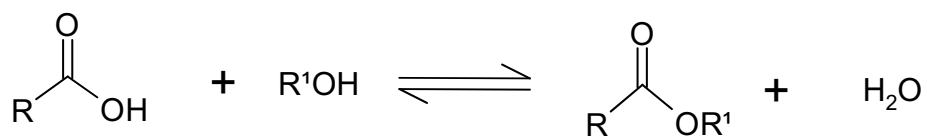
As lipases se destacam entre as hidrolases devido as suas múltiplas aplicações e são de grande importância, pois podem ser utilizadas nas indústrias de detergentes, medicamentos, alimentos, têxteis, cosméticos, biodiesel, entre outros. (JAEGER; REETZ, 1998). Catalisam reações de esterificação, inesterificação, transesterificação, hidrólise, entre outras (PAQUES; MACEDO, 2006), como mostra a Figura 1.

Figura 1 - Reações catalisadas por lipases

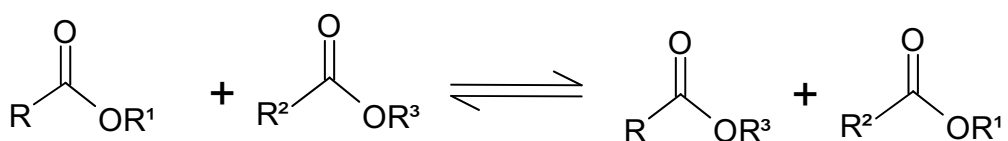
Hidrólise



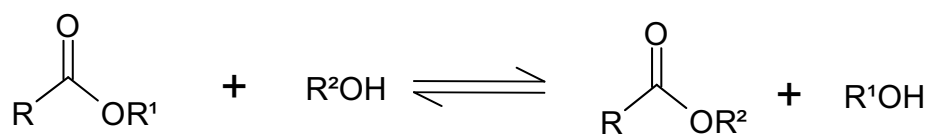
Esterificação



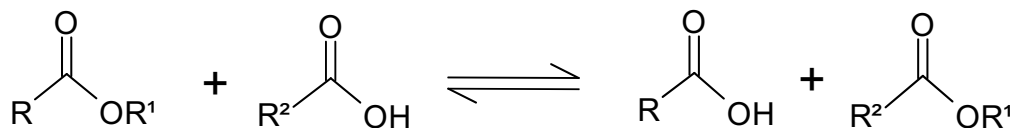
Interesterificação



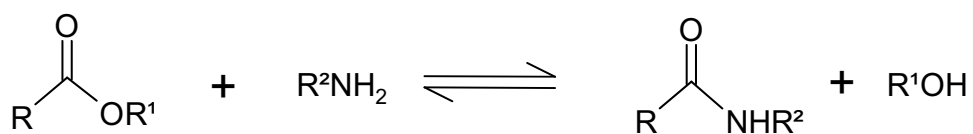
Alcólise



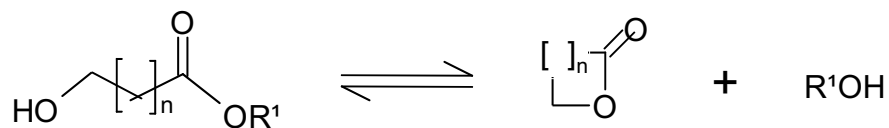
Acidólise



Aminólise



Lactonização



Fonte: ANDRADE, 2013 adaptado de PAQUES, MACEDO 2006.

3.2 PRODUÇÃO DE LIPASES

É de extrema importância a composição do meio e as condições de fermentação na produção de lipases, como também identificar uma formulação em que o meio seja efetivo, além da condição da cultura para a otimização da produção (Liu et al., 2006).

Há dois tipos de produção de lipases: fermentação submersa (FSM), que é relacionada ao crescimento microbiano e utiliza um meio de cultura líquido, e por fermentação em estado sólido (FES), que são substratos insolúveis com pequena porcentagem de água em sua composição.

Existem vantagens e desvantagens da FES quando comparada com a FSM, quanto à produção de enzimas. Na FES os substratos geralmente apresentam baixo custo, dado ao reaproveitamento de resíduos agroindustriais, mas como desvantagem da FES têm-se a não homogeneidade do meio de cultivo, limitação de transferência de massa e dificuldade de monitorar e controlar os parâmetros operacionais. Já as vantagens da FSM está a homogeneidade do sistema, possibilitando uma transferência de calor mais eficiente, podendo controlar parâmetros como pH, temperatura e oxigenação. Porém, a principal desvantagem é o elevado custo do processo, podendo tornar inviável a produção nas indústrias (BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001; SINGHANIA et al., 2009). Desta forma, para minimizar os custos da produção por FSM o uso de resíduos agroindustriais são opções viáveis, já que toneladas de resíduos são dispensadas pela agroindústria, que parecem não ter nenhuma função, mas são materiais ricos em nutrientes: proteínas, carboidratos, lipídios, dentre outras substâncias, que são facilmente metabolizadas por cepas microbianas (VARGAS et al., 2013).

3.3 *Botryosphaeria ribis* EC-01 COMO PRODUTOR DE LIPASE

Desde 1995, a bioquímica e fisiologia de fungos da família *Botryosphaeriaceae* vem sendo estudada e foi quando isolaram o ascomiceto *Botryosphaeria* sp.(MAMB-05) de cancro de eucalipto (BARBOSA et al., 1995) Nove isolados do gênero *Botryosphaeria* foram cultivados separadamente em oito óleos vegetais diferentes (soja, oliva, girassol, milho, canola, babaçu, gergelim e algodão),

e também em glicerol, em condição de fermentação submersa, para selecionar o melhor produtor de lacase e lipase. *B. rhodina* MAMB-05 destacou-se como produtor de lacase em todos os óleos avaliados, enquanto que *B. ribis* EC-01 foi o melhor produtor de lipase nos cultivos contendo óleo de milho, óleo de soja ou glicerol (MESSIAS et al., 2009).

A produção de lipase pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi avaliada de acordo com planejamentos fatoriais e análise por Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Ao utilizar torta de soja como substrato, foram obtidos altos índices de lipases otimizada ($76,57 \pm 7,97$ U/mL). Com base nos nutrientes usados, o custo de produção foi de US \$ 0,42 por litro de meio e esta enzima foi imobilizada em Celite com ótima atividade (149 U/g).

3.4 ÓLEOS E TORTAS VEGETAIS COMO SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE LIPASES

Há diversos fatores que interferem na quantidade de lipases produzidas, tais como fontes de nitrogênio e carbono, presença de indutores ou inibidores, de lipídios, concentração de sais inorgânicos, temperatura, pH, inóculo e disponibilidade de oxigênio (CASTILHO et al., 2000), sendo as fontes de carbono uma das mais essenciais para a obtenção de rendimentos elevados.

Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa. Portanto óleos e gorduras têm sido utilizados como indutores na produção de lipases por diversas espécies. A Tabela 1 exemplifica algumas condições utilizadas e seus resultados.

As tortas vegetais também são muito utilizadas na produção de enzimas já que estas geralmente possuem em sua composição carbono, nitrogênio e outros elementos (RAMACHANDRAN et al., 2007). Entretanto, sua utilização é mais comum na produção de enzimas por FES.

Tabela 1 - Fontes lipídicas na produção de lipases por fermentação submersa

A	Tempo	Temp.	Agit.	Fonte de	Fonte de	Outras fontes	Atividade lipase	Referência
Micro-organismo	(h)	(°C)	(rpm)	Carbono	Nitrogênio		U/mL U/mg	
<i>Penicillium sp</i>	120	28	180	1% óleo oliva, 5% peptona	1% extrato levedura	0,5% NaNO ₃ , 0,5% KCl, MgSO ₄ , 2% KH ₂ PO ₄	308,73	DHEEMAN et al., 2011
<i>Bacillus subtilis</i>				5% óleo usado 0,25% óleo oliva	0,5% extrato de levedura	10 mM Ca ²⁺	4,96	SUCI; ARBIANTI; HERMANSYAH, 2018
<i>Fusarium oxysporum</i>				4% peptona 1,5% óleo oliva	3% extrato levedura	1,2% NaH ₂ PO ₄ 0,2% KH ₂ PO ₄ 0,03% MgSO ₄ 0,025% CaCl ₂	16	RIFAAT et al., 2010
<i>Aspergillus carneus</i>	92	37	250	1,5% óleo de girassol, 0,5% peptona 1% glicose		0,25% KH ₂ PO ₄ 0,05% KCl 0,05% MgSO ₄	7,2	SAXENA et al., 2003

Fonte: Autoria Própria (2019).

3.5 MARACUJÁ – AMARELO – *PASSIFLORA EDULIS*

O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*) possui em sua composição inúmeros compostos bioativos como glicosídeos, alcaloides e compostos fenólicos (DHAWAN, 2004). O Brasil ocupa papel de destaque como o maior produtor mundial do fruto com 554.598 toneladas colhidas em 2011 (EMBRAPA, 2017). Aproximadamente 70 a 80% do peso do fruto não é aproveitado pelas indústrias de suco, sendo assim, sobrando um grande volume de resíduos que não seriam utilizados.

As sementes são parte do resíduo que foi gerado quando o maracujá foi processado, possuindo um elevado teor de óleo em sua composição. Esse óleo é composto por predominância de ácidos graxos insaturados (oleico e linoleico), considerados de alto valor nutricional e tecnológico, tendo um forte potencial para a aplicação desse óleo na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética, entre outras (CHAU; HANG, 2004; MALACRIDA; JORGE, 2012).

Portanto, o óleo e a semente de *Passiflora edulis* extraído de sementes de maracujá constituem fontes promissoras para crescimento de micro-organismos e produção de enzimas, devido sua disponibilidade e custo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

As sementes de maracujá foram fornecidas pela empresa Polpa Norte (Japurá-PR).

Foi utilizado como substrato para a atividade hidrolítica de lipase o éster palmitato de *p*-nitrofenila adquirido de Sigma-Aldrich (EUA).

Os demais reagentes foram de grau analítico.

4.1.1 Meios de cultivo

Tabela 2 - Meio BDA (Batata Dextrose Agar)

Batata	20 g
Dextrose	2,0 g
Ágar	1,5 g
Água destilada qsp	100 mL

Fonte: Autoria Própria (2019).

Tabela 3 - Meio mínimo de sais de Vogel*

Citrato de sódio. 5 ½ H ₂ O	150 g	Solução de Elementos-traços:	
KH ₂ PO ₄ anidro	250 g	Ácido cítrico. 1 H ₂ O	5,0 g
NH ₄ NO ₃ anidro	100 g	ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	5,0 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	10,0 g	Fe(NH ₄) ₂ . 6 H ₂ O	1,0 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	5,0 g	CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,25 g
Solução de elementos-traços	5,0 mL	MnSO ₄ . 1 H ₂ O	0,05 g
Solução de biotina 0,1 mg/mL	2,5 mL	H ₃ BO ₃ anidro	0,05 g
Água destilada qsp.	1000 mL	Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,05 g
		Água destilada qsp.	100 mL

Fonte: Autoria Própria (2019).

*Concentrado 50 vezes

4.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.2.1 Amostragem e preparo das sementes

As sementes foram lavadas, para retirada de resíduos, e secas em estufa a 60 °C por aproximadamente 4 horas e posteriormente armazenadas em ambiente refrigerado. As sementes de maracujá foram trituradas e peneiradas em peneira de 2,4 mm.

4.2.2 Extração de lipídios totais

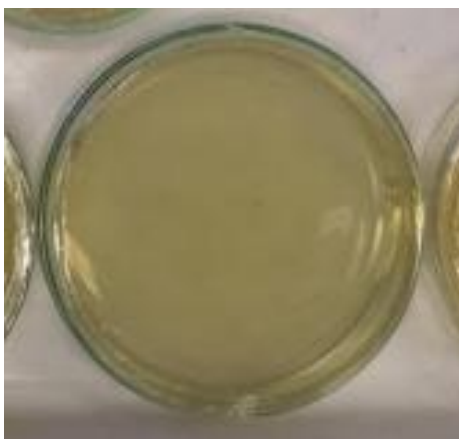
O método de extração seguiu o proposto por Bligh & Dyer (1959) modificado. Cinco gramas de semente foram misturados com etanol, hexano e água em agitação magnética por 5 minutos. Posteriormente, a mistura foi filtrada a vácuo e o filtrado foi armazenado em um funil de separação e deixado em repouso por um dia. A fração inferior contendo os lipídios foi recolhida em balão de fundo chato e rotaevaporado a 40 °C. Após a evaporação, o óleo foi recolhido e armazenado em ambiente refrigerado.

4.2.3 Produção de inóculo e obtenção de lipases

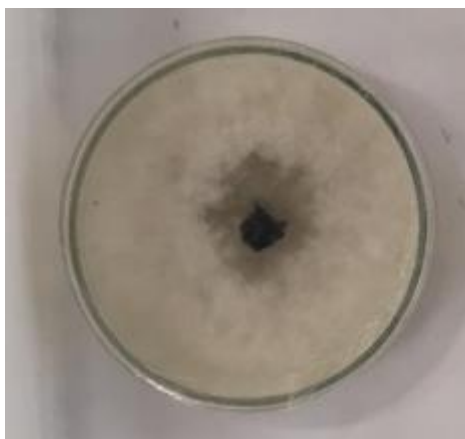
O micro-organismo utilizado foi o *Botryosphaeria ribis* EC-01 (GenBank Accession Number DQ852308) que foi mantido em BDA (Batata Dextrose Agar) inclinado a 4 °C ± 2 °C e repicado trimestralmente. Foram confeccionadas placas de BDA para serem utilizadas como meio sólido (Figura 2).

Para o repique o micro-organismo foi transferido de seu meio de manutenção para as placas contendo meio BDA e deixadas em estufa durante 5 dias a 28 °C para crescimento do fungo. A Figura 3 ilustra a placa contendo o micro-organismo crescido após cinco dias.

Figura 2 - Placas contendo o meio de cultivo BDA



Fonte: Aatoria Própria (2019).

Figura 3 - *Botryosphaeria ribis* EC-01 crescido no meio BDA após 5 dias a 28 ± 2 °C

Fonte: Aatoria Própria (2019).

Após este tempo, esferas de 0,7 cm de diâmetro foram cortadas e usadas para inocular frascos de *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 25 mL de meio composto por óleo de *P. edulis* (0,5 a 1,5 %, *m/v*), glicerol PA (1,3 a 4,7 %, *m/v*) e sementes de maracujá (0,5 a 5 %, *m/v*), de acordo com planejamentos fatoriais 2^3 com triplicata no ponto central (17 experimentos). As Figuras 3 e 4 ilustram, respectivamente, os frascos contendo o meio fermentativo autoclavados (autoclave a 105° C por 20 minutos) e a placa contendo o micro-organismo crescido, onde esferas de 0,7 cm foram cortadas para inocular os frascos com o meio.

Figura 4 - Meio fermentativo composto por óleo de *Passiflora edulis*, glicerol, sementes de maracujá



Fonte: Aatoria Própria (2019).

Figura 5 - Esferas de 0,7 cm de diâmetro do micro-organismos crescido sendo cortadas para inocular o meio fermentativo



Fonte: Aatoria Própria (2019).

Os cultivos foram mantidos sob agitação, em *shaker* (180 rpm) por 5 dias a 28°C, e interrompidos por centrifugação (9000 rpm/15 min). Os extratos brutos livres de células foram armazenados a - 4°C até determinação da atividade de lipases.

A Tabela 1 apresenta os níveis de variação para os fatores estudados na produção de lipases. Duas condições de fermentação foram avaliadas; presença de meio mínimo de sais de Vogel (MMSV) e somente água.

Tabela 4 - Níveis de variação para os fatores dos planejamentos fatoriais 23 adicionado de pontos axiais e centrais para avaliação da produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 por fermentação submersa com ou sem adição de meio mínimo de sais de Vogel

Variáveis	Níveis reais e codificados				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
X ₁ semente (% m/v)	0,5	1,4	2,75	4,1	5
X ₂ glicerol (% m/v)	1,3	2	3	4	4,7
X ₃ óleo (% m/v)	0,5	0,7	1	1,3	1,5

Fonte: Autoria Própria (2019).

Os resultados dos planejamentos fatoriais desenvolvidos foram ajustados de acordo com uma equação polinomial (1) utilizando a técnica de regressão múltipla, onde Y é a resposta preditiva de atividade de lipase, sendo uma variável dependente, x_i e x_j são variáveis independentes codificadas e β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} são coeficientes constantes.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=j}^k \beta_{ii} x_i x_j + \sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

As equações polinomiais quadráticas foram ajustadas para correlacionar as variáveis e a resposta. Os coeficientes de regressão (R^2) foram utilizados para expressar a qualidade do ajuste dos modelos polinomiais e a significância estatística foi determinada pelo teste-F.

Análises de variância (ANOVA) e de regressão múltipla foram realizadas ao nível de 10 % de significância utilizando o programa STATISTICA Version 8.0[®].

4.2.4 Determinação da atividade de lipase

A atividade da lipase foi determinada pelo espectrofotômetro utilizando palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) como substrato, que se baseia na hidrólise do *p*NPP, em meio aquoso, contendo Triton X-100. A liberação de *p*-nitrofenol pela ação da lipase foi quantificada espectroscopicamente no comprimento de onda de 410 nm.

A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 0,05 mol/L (pH 8) a 55 °C por 2 minutos e quantificada a 410 nm (MESSIAS et al., 2009). O coeficiente de

extinção molar para o *p*NPP: $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para correlacionar a concentração do produto com a absorvância obtida na leitura. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como 1 μmol de *p*NPP (*p*-nitrofenol), liberado por minuto por mL da solução da enzima.

O procedimento foi iniciado pelo preparo das soluções abaixo:

a) Solução A: palmitato de *p*-nitrofenila em isopropanol, em uma concentração de 3,0 mg/mL ;

b) Solução B: 2,0 g de Triton X-100 dissolvidos em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol/L , pH 8,0.

1,0 mL da solução A foi adicionada em 10,0 mL da solução B. Em banho termostatizado a 55 °C, 0,90 mL da mistura foi adicionado em um tubo de ensaio e em seguida, 0,10 mL do extrato enzimático também foi adicionado. Para o controle da reação será utilizado 0,10 mL de água destilada, no lugar do extrato enzimático. Decorrido dois minutos de reação, a leitura da atividade será efetuada a 410 nm .

Para o cálculo da atividade enzimática livre e imobilizada foi utilizada a fórmula geral:

$$U/\text{mL} = \left[\frac{[Abs]}{\varepsilon} \times \frac{1}{V_e} \times \frac{1}{t_r} \times DF \times 10^3 \right] \quad (2)$$

Em que:

U/mL : unidade de atividade enzimática da solução da enzima, definida de acordo com o método utilizado, nas condições padrão de ensaio;

$[Abs]$ = absorvância a λ (nm);

ε = coeficiente de extinção molar ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);

V_e = volume de enzima utilizado no ensaio (mL);

t_r = tempo de reação (minutos);

DF = fator de diluição;

10^3 = fator de conversão de mol/L para $\mu\text{mol/mL}$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para uma análise mais rápida que permita a obtenção de uma grande quantidade de dados numéricos e informações de um sistema, podem-se aplicar ferramentas estatísticas. Neste caso foi usado o planejamento fatorial, que é uma ferramenta simples, mas importante, pois permite a observação dos efeitos de variáveis e a modificação entre elas, permitindo entender processos monitorados em um determinado sistema, sendo sempre aplicadas nas análises de otimização. Deste modo, essa metodologia está associada à análise de superfície de respostas, fornecendo informações seguras sobre o processo, com a tentativa de minimizar experimentos que envolvam técnicas de tentativa e erro (BOX; HUNTER; HUNTER., 1978).

As Tabelas seguintes apresentam os resultados obtidos nos dois planejamentos fatoriais 2^3 realizados em meio fermentativa contendo o MMSV e em meio fermentativo contendo somente água, respectivamente.

Na Tabela 5 é possível verificar os resultados obtidos para a produção de lipases em meio fermentativa contendo o MMSV. Os resultados para a atividade volumétrica variaram de 2,17 a 11,2 U/mL, este último valor encontrado no experimento 5 onde as variáveis semente, glicerol e óleo foram de 2,75 % (m/v), 1,3 % (m/v) e 1 % (m/v), respectivamente. Já para a atividade por grama de substrato seco (U/gss) o melhor resultado foi no experimento 9, com 628 U/gss. Entretanto quando comparado com os resultados obtidos no planejamento onde o meio fermentativo foi composto por água, este planejamento não apresentou os melhores resultados. Portanto os resultados não foram analisados pelo software STATISTICA®.

Este mesmo comportamento foi verificado em estudos anteriores da produção desta enzima quando *B. ribis* EC-01 foi cultivado separadamente nas tortas de soja, mamona e milho a 1 % (m/v), com ou sem adição de MMSV em condição de fermentação submersa. O meio contendo torta de soja promoveu maior produção de lipase sem adição de outro complemento, somente água, seguida da torta de mamona (BARBOSA et al., 2011). O MMSV é um meio altamente nutritivo contendo diversos sais e outros elementos (VOGEL, 1956), portanto, de custo elevado. A não utilização deste meio torna-se o processo de produção desta enzima mais viável.

Tabela 5 - Planejamento fatorial para produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 por fermentação submersa com adição de meio mínimo de sais de Vogel

Nº do experimento	Variáveis codificadas			Respostas	
	X ₁	X ₂	X ₃	U/mL	U/gss
1	-1	-1	-1	3,37	241
2	-1	-1	1	2,87	205
3	-1	1	-1	4,57	326
4	-1	1	1	4,83	345
5	1	-1	-1	11,2	274
6	1	-1	1	6,81	166
7	1	1	-1	2,50	60,9
8	1	1	1	2,17	52,9
9	-1,68	0	0	3,14	628
10	1,68	0	0	2,56	51,1
11	0	-1,68	0	7,62	277
12	0	1,68	0	4,15	151
13	-0	0	-1,68	7,0	254
14	0	0	1,68	6,44	234
15	0	0	0	4,73	172
16	0	0	0	4,37	159
17	0	0	0	5,12	186

Variáveis	Níveis reais e codificados				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
X ₁ semente (% m/v)	0,5	1,4	2,75	4,1	5
X ₂ glicerol (% m/v)	1,3	2	3	4	4,7
X ₃ óleo (% m/v)	0,5	0,7	1	1,3	1,5

Fonte: Autoria Própria (2019).

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos com o planejamento fatorial (2^3) para a produção de lipases sem adição de MMSV, ou seja, meio fermentativo contendo os nutrientes e adição somente de água. As variáveis independentes avaliadas foram U/mL (atividade volumetria de lipase) e U/gss (Unidade de atividade por grama de substrato seco). Em relação à produção da enzima em U/mL houve variação de 1,182 a 33,60 U/mL dependendo da concentração de semente e óleo de maracujá e também de glicerol. A atividade máxima (33,6 U/mL) foi alcançada quando os fatores semente (X₁) e óleo (X₃) estavam no ponto central (0) ou seja 2,75 % (m/v) e 1 % (m/v), respectivamente e quando glicerol (X₂) estava no nível axial inferior (-1,68), ou seja 1,3 % (m/v). O glicerol apresentou efeito negativo na produção desta enzima, o que pode ser verificado nos ensaios 11 e 12, quando o

nível de variação foi aumentado de -1,68 para 1,68, a atividade caiu para 1/3 deste valor.

Tabela 6 - Planejamento fatorial para produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 por fermentação submersa sem adição de meio mínimo de sais de Vogel

Nº do experimento	Variáveis codificadas			Respostas	
	X ₁	X ₂	X ₃	U/mL	U/gss
1	-1	-1	-1	1,875	133,9
2	-1	-1	1	2,425	173,2
3	-1	1	-1	0,4643	33,16
4	-1	1	1	3,841	274,4
5	1	-1	-1	25,93	632,7
6	1	-1	1	2,751	67,12
7	1	1	-1	7,871	191,9
8	1	1	1	9,333	227,7
9	-1,68	0	0	1,182	236,4
10	1,68	0	0	10,09	201,9
11	0	-1,68	0	33,60	1222
12	0	1,68	0	11,36	413,2
13	0	0	-1,68	10,80	392,9
14	0	0	1,68	18,73	681,3
15	0	0	0	22,55	820,1
16	0	0	0	23,79	865,0
17	0	0	0	22,68	824,5

Variáveis	Níveis reais e codificados				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
X ₁ semente (% m/v)	0,5	1,4	2,75	4,1	5
X ₂ glicerol (% m/v)	1,3	2	3	4	4,7
X ₃ óleo (% m/v)	0,5	0,7	1	1,3	1,5

Fonte: Autoria Própria (2019).

De acordo com o modelo de 2ª ordem, menores concentrações de semente e óleo de maracujá melhoram a atividade de lipase ($p \leq 0,1$). O valor de $R^2 = 0,77$ e $F_{cal} > F_{tab}$ ($14,7 > 2,56$) obtidos mostraram que o modelo é confiável e estatisticamente significativo ($p \leq 0,1$) (Tabela 7). A equação preditiva (3) é mostrada abaixo, onde os termos significativos estão em negrito:

$$\begin{aligned}
 U/\text{mL} = & \mathbf{23,47} + \mathbf{3,83 X_1} - \mathbf{7,70 X_1^2} - 3,58 X_2 - 1,73 X_2^2 - 0,33 X_3 - \mathbf{4,47 X_3^2} - 1,44 X_1 X_2 \\
 & - 3,21 X_1 X_3 + 3,43 X_2 X_3
 \end{aligned}
 \tag{3}$$

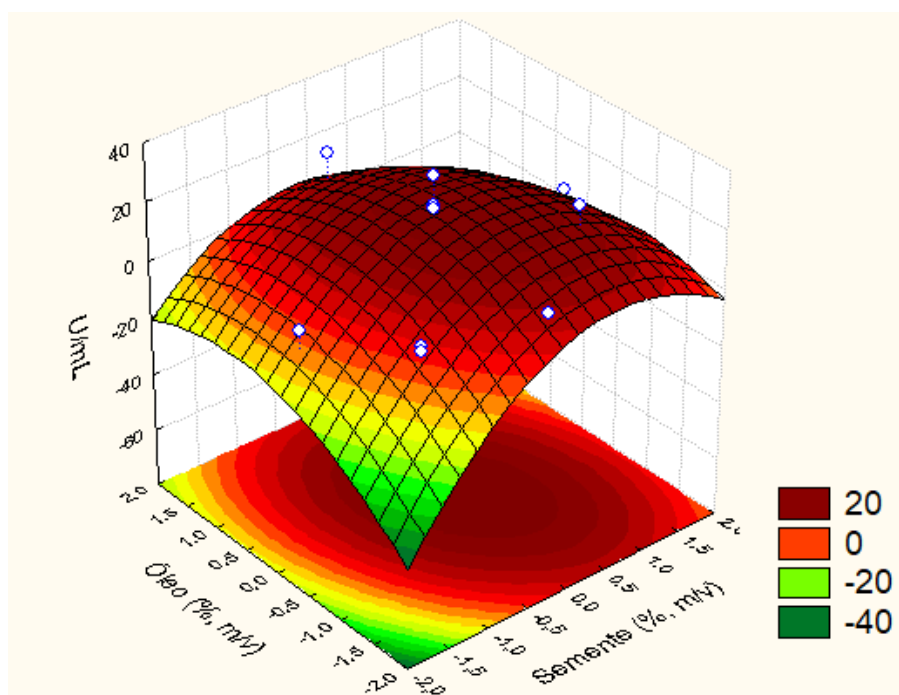
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial 23 para a produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 por fermentação submersa sem adição de meio mínimo de sais de Vogel (U/mL)

Resposta	Fonte de variação	Soma Quadrados (SS)	Graus de Liberdade (DF)	Média Quadrados (MS)	F teste	
					F_{calc}^a	F_{list}
U/mL	Modelo	1310	3	436,7	14,7	2,56
	Resíduo	385,3	13	29,64		
	Total	1695	16			

Fonte: Autoria Própria (2019).

De acordo com a superfície resposta gerada pelo modelo a máxima produção de lipases estimada (30 U/mL) foi alcançada quando as concentrações de semente e óleo foram de 3,8 % (m/v) e 0,6 % (m/v), respectivamente (Figura 6).

Figura 6 - Superfície de resposta para a produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 por fermentação submersa sem adição de meio mínimo de sais de Vogel (U/mL)



Fonte: Autoria Própria (2019).

Na Tabela 6 também é possível observar os resultados da variável dependente U/gss que variou de 33,16 a 1222 U/gss, sendo a melhor resposta

obtida também no ensaio 11 quando os fatores semente (X_1) e te, glicerol (X_2) e óleo (X_3) foram de 2,75 % (m/v), 1,3 % (m/v) e 1 % (m/v), respectivamente.

O modelo quadrático está apresentado na Tabela 8 e mostra que $F_{\text{calc}} > F_{\text{list}}$ nos graus de liberdade correspondentes à produção de lipases em U/gss. O valor F e o valor do coeficiente de regressão (R^2) mostram que o modelo ajustado teve boa capacidade preditiva e é estatisticamente válido.

Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial 23 para a produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 por fermentação submersa sem adição de meio mínimo de sais de Vogel (U/gss)

Resposta	Fonte de variação	Soma	Graus de	Média	F teste	
		Quadrados	Liberdade	Quadrados	F_{calc}^a	F_{list}
		(SS)	(DF)	(MS)		
U/gss	Modelo	1395460	2	697730	20,0	2,73
	Resíduo	488380	14	34884		
	Total	1883840	16			

$R^2 = 0,74$ ^a $F_{90\%,2,14}$

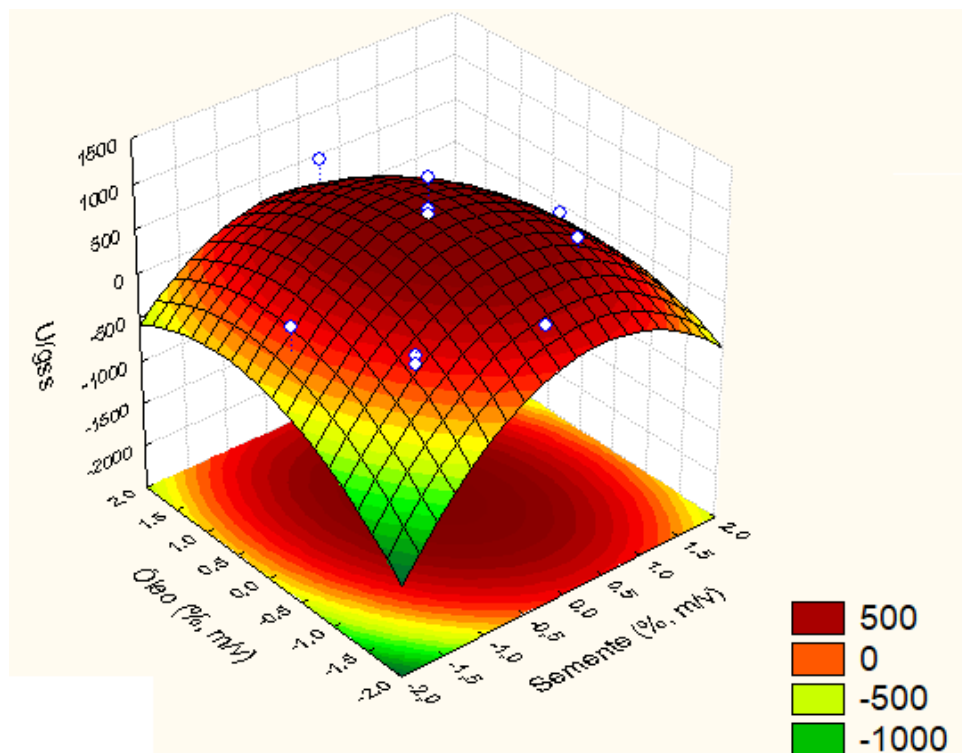
Fonte: Autoria Própria (2019).

A equação polinomial quadrática (4) está mostrada abaixo, onde pode-se observar que novamente as variáveis semente e óleo de soja foram significativas na produção de lipases ($p \leq 0,1$). Os fatores significativos assim como os efeitos de interação estão em negrito nesta equação.

$$\begin{aligned}
 \text{U/gss} = & \mathbf{885,8} + 32,73 X_1 - \mathbf{283,1 X_1^2} - 120,0 X_2 - 71,02 X_2^2 + 17,24 X_3 - \\
 & \mathbf{170,4 X_3^2} - 35,07 X_1 X_2 - 101,3 X_1 X_3 + 100,4 X_2 X_3
 \end{aligned}
 \tag{4}$$

O gráfico de superfície de resposta gerado a partir do ajuste do modelo (Figura 7) indica a influência das variáveis na produção de lipases em U/gss e a resposta obtida do modelo linear preditivo foi 924 U/gss quando semente, glicerol e óleo foram de 3 % (m/v), 1,87 % (m/v) e 0,9 % (m/v), respectivamente.

Figura 7 - Superfície de resposta para a produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 por fermentação submersa sem adição de meio mínimo de sais de Vogel (U/gss)



Fonte: Autoria Própria (2019).

Planejamentos fatoriais já foram utilizados para estudar a produção de lipases por este fungo. O valor máximo obtido foi de 77 U/mL em condição otimizada contendo 2,4 % (m/v) de torta de soja e 4,5 % (m/v) de glicerol. O custo deste meio foi determinado como US \$ 0,42, considerando-se apenas os nutrientes e água adicionados (ANDRADE et al., 2013).

Se for levado em consideração que o máximo de produção estimada pelo modelo neste trabalho foi de 30 U/mL (equivalente a quase 40 % do obtido por Andrade et al. (2013)) e que o modelo predito por este trabalho sugere o uso de menor quantidade de glicerol (somente 1,3 % (m/v)), a produção desta enzima pode ser mais vantajosa economicamente com o óleo e sementes de maracujá.

Planejamentos fatoriais são muito utilizados para otimização da produção de enzimas como as lipases. Geoffry e Achur (2018) estudaram a produção de lipases por *Fusarium solini* em um meio complexo com as variáveis: extrato de malte, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 , MgSO_4 , óleo de oliva, peptona, K_2HPO_4 , NaNO_3 , Tween-80 e efluente da extração de óleo de palma, assim como ajuste de pH. Máximo de produção alcançada foi de 7,8 U/mL, sendo as variáveis significativas

K_2HPO_4 , $NaNO_3$, e Tween-80. O presente trabalho utilizando um resíduo da agroindústria, sementes de maracujá, assim como óleo extraído de forma simples, conseguiu resultados superiores ao relatado por estes autores. Demonstrando mais uma vez a importância deste estudo em criar novas metodologias de produção mais verdes e mais econômicas

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que as sementes e o óleo extraído das sementes de *Passiflora edulis* são viáveis como nutrientes para a produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 sob condição de fermentação submersa.

A adição de meio mínimo de sais de Vogel não foi favorável para a produção desta enzima, sendo assim, os cultivos contendo somente água tiveram os maiores valores de produção de lipases.

A produção foi avaliada por planejamentos fatoriais e análise por metodologia de superfície de resposta (MSR). A condição ótima predita foi 30 U/mL quando as concentrações de semente e óleo foram de 3,8 % (m/v) e 0,6 % (m/v), respectivamente. Neste modelo o glicerol exerceu influência negativa na produção. Enquanto que a produção em U/gss predita foi de 924 U/gss, quando semente, glicerol e óleo foram de 3 % (m/v), 1,87 % (m/v) e 0,9 % (m/v), respectivamente.

Este estudo agrega valor a estes resíduos da agroindústria, como também propõe uma maneira econômica de produzir lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. maria et al. Lipase production by botryosphaeria ribis ec-01 on soybean and castorbean meals: Optimization, immobilization, and application for biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 10, p. 1792 – 2806, 2013.
- BARBOSA, A. M. et al. Soybean oil and meal as substrates for lipase production by botryosphaeria ribis, and soybean oil to enhance the production of botryosphaeran by botryosphaeria rhodina: Optimization, immobilization, and application for biodiese production. **Tzi Bun Ng, Intech**, Croácia, p. 101 – 118, 2011.
- BARBOSA, r. f. h. D. artur maria; KURTBÖKE iada; HARDY george erge. In-vivo decolorisation of poly r-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation. 4th pacific rim biotechnol: Optimization, immobilization, and application for biodiesel production. **Conf Melbourne**, Austr´alia, p. 88 – 90, 1995.
- BIANCHI, L. V.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. **Biotecnologia industrial**, São Paulo, v. 3, p. 264, 2001.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building**. New York: Wiley, 1978.
- CASTILHO, L. R. et al. Economic analysis of lipase production by penicillium restrictum in solid state and submerged fermentatios. **Biochemical engineering journal**, v. 4, p. 239 – 247, 2000.
- CHAU, C. F.; HUANG, Y. L. Characterization of passion fruit seed fibres: a potential fibre source, food chemistry. **Food Chemistry**, v. 85, p. 189, 2004.
- DHEEMAN, D. S. et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain penicillium sp. ds-39 (dsm 23773). **Journal of Molecular Catalalysis B: Enzymatic**, v. 72, p 256 – 262, 2011
- GEOFFRY, R. N. A. K. Optimization of novel halophilic lipase production by fusarium solani strain nfcl 4084 using palm oil mill efluente. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, p. 327 – 334, dezembro 2018.
- GHOSH, paula kaaren et al. Microbial lipases: production and applications. **Science Progress**, v. 79, n. 2, p. 119 – 157, 1996.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235 – 251, 2006.
- IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**. 2013. Disponível em: <<http://www.sidra.gov.br/bda/tabela/listabl.asp>>. Acesso em: 7 de agosto 2019.
- IBGE. **Produção Agrícola Municipal: produção brasileira de maracujá**. 2017. Disponível em:

<http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/maracuja/b1_maracuja.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2019.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 13, p. 390 – 397, 2002.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. current opinion in biotechnology. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 13, p. 390 – 397, 2002.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.16 n.9, p. 396 – 403, 1998.

LIU, C.-G.; LU, W. B.; CHANG, J. S. Optimizing lipase production of burkholderia sp. By response surface methodology: a review. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1940 – 1944, 2006.

MALACRIDA, C. R.; JORGE, N. Yellow passion fruit seed oil (*passiflora edulis* f. *flavicarpa*): physical and chemical characteristics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p.127, 2012.

MESSIAS, J. M. et al. Screening botryosphaeria species for lipases: Production of lipase by botryosphaeria ribis ec-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 426 – 431, 2009.

MESSIAS, J. M. et al. Microbial lipases: Production of lipase by botryosphaeria ribis ec-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 426 – 431, 2011.

METHA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: a review. **Journal of Biotechnology Research**, v. 8, p. 58 – 77, 2017.

PANDEY, A. et al. The realm of microbial lipases in biotechnology. *biotechnology applied biochemistry*. v. 29, p. 119 – 131, 1999.

PAQUES, F. W.; MACEDO, A. G. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93 – 99, 2006.

RAMACHANDRAN, S. et al. Oil cakes and their biotechnological applications: A review. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2000 – 2009, 2007.

RIFAAT, H. M. et al. Production, optimization and partial purification of lipase from *fusarium oxysporum*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, p. 327 – 334, dezembro 2018.

SAXENA, R. K. et al. Purification strategies for microbial lipases. **Journal Microbiology Methodology**, v. 52, p. 1 – 18, 2003.

SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K. Biotechnological approach of microbial lipase: a review. **Biotechnology**, v. 10, p. 23 – 40, 2011.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 2, p. 627 – 662, 2001.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13 – 18, 2009.

SUCI, M.; ARBIANTI, R.; HERMANSYAH, H. Lipase production from bacillus subtilis with submerged fermentation using waste cooking oil. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 105, p. 120 – 126, janeiro 2018.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for neurospora. **Microbial Genetics Bulletin**, v. 13, p. 42, 1956.