

PRODUÇÃO DE LIPASE MICROBIANA A PARTIR DE RESÍDUOS DE CORVINA

Gean Pablo Silva Aguiar. E-mail: g.pablo@hotmail.com
Vilásia Guimarães Martins. E-mail: vilasiamartins@gmail.com
Paola Chaves Chaves Martins. E-mail: pah_chaves@hotmail.com
Raphael Aparecido Boschero. E-mail: r.boschero@hotmail.com
Carlos Prentice-Hernández. E-mail: dqmprent@furg.br

Resumo: A produção de lipase por via microbiana tem apresentado destaque devido à sua larga aplicação industrial nas indústrias alimentícia, farmacêutica e no tratamento de efluentes. O objetivo deste estudo é produzir lipase a partir de resíduos do pescado Corvina (*Micropogonias furnieri*), valorizando este resíduo agroindustrial. Os cultivos foram realizados em biorreatores, onde foram avaliados: a influência dos micro-organismos *Bacillus subtilis* e *Corynebacterium aquaticum*, concentração de pescado e os biorreatores com e sem chicanas. Os resultados encontrados de atividade lipolítica máxima para o planejamento de biorreatores sem chicana foi de 15,91 U.mL⁻¹ de atividade lipolítica e 0,22 U.mL⁻¹.h⁻¹ de produtividade. Para o planejamento utilizando biorreatores com chicanas obteve-se cerca de 11,45 U.mL⁻¹ para atividade e 0,15 U.mL⁻¹.h⁻¹ para produtividade. Por fim, o melhor ensaio em ambos biorreatores é o que utilizou 0,83% de pescado e o micro-organismo *Corynebacterium aquaticum*.

Palavras-chave: *Micropogonias Furnieri*; *Bacillus Subtilis*; *Corynebacterium Aquaticum*; Atividade Lipolítica.

LIPASE MICROBIAL PRODUCTION FROM WHITEMOUTH CROAKER WASTES

Abstract: Lipase production by microbial pathway has submitted highlight due to its wide industrial application in food, pharmaceutical industries and in the effluents treatment. The cultures were performed in bioreactors flasks, where they were evaluated: the influence of microorganisms *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium aquaticum*, fish concentration and bioreactors with and without baffles. Growing conditions were 200 rpm, 30°C for 72 h. The results found maximum lipolytic activity for planning with bioreactors flask without baffles 15.91 U.mL⁻¹ and 0.22 U.mL⁻¹.h⁻¹ productivity and for planning using bioreactors with baffles was about 11.45 U.mL⁻¹ for activity and 0.15 U.mL⁻¹.h⁻¹ to productivity. Finally, the best test that both the bioreactor is utilized and 0.83% fish microorganism *Corynebacterium aquaticum*.

Keywords: *Micropogonias furnieri*; *Bacillus subtilis*; *Corynebacterium aquaticum*; lipase activity.

1. INTRODUÇÃO

A lipase apresenta como principal função biológica catalisar a hidrólise de longas cadeias de triacilglicerídeos. As principais fontes de obtenção de lipases para aplicação industrial têm sido os micro-organismos, embora estas também possam ser produzidas por plantas e animais (MESSIAS et al., 2011; JESUS et al., 2016; REINEHR et al., 2016). Ao contrário de muitas outras enzimas, as lipases demonstram níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, o que facilita a catálise de muitas reações, tais como esterificação e transesterificação (DIAZ et al., 2006).

A lipase foi primeiramente isolada do suco pancreático por Claude Bernard em 1859, que verificou que esta enzima solubilizava gotas de óleo. Anos após a sua descoberta, o interesse pelas lipases microbianas aumentou devido ao fato desta apresentar estabilidade e facilidade de obtenção em comparação com as de origem animal (HASAN et al., 2006).

A produção de lipase vem sendo desenvolvida por fermentação submersa e está associada ao crescimento microbiano e, conseqüentemente, às variações da composição e condições de cultivo (ROVEDA et al., 2010). Porém, a lipase também pode ser produzida por fermentação em estado sólido. A produção de lipase via fermentação em estado sólido tem sido relatada a partir de estudos, principalmente com fungos filamentosos e pouco sobre bactérias e leveduras; utilizando resíduos da agroindústria (PANDEY, 2003).

Uma das principais aplicações industriais das lipases tem sido como aditivos em detergentes, pois facilitam os processos de limpeza, hidrolisando os lipídeos e favorecendo a solubilização destas biomoléculas em água. A principal vantagem do uso de lipases nos detergentes, em substituição aos polissulfatos, está na biodegradabilidade e redução dos impactos ambientais, incluindo-se a vida aquática (HASAN et al., 2006).

Os resíduos provenientes do processo de filetagem de pescado gerados em grandes quantidades pelas indústrias pesqueiras, geralmente não são descartados corretamente, sendo descartados em alto mar ou descartados em locais não apropriados, gerando uma contaminação microbiológica alta e como isso afetando o meio ambiente (AGUIAR et al., 2015). A corvina é uma das espécies de pescado de maior captura do litoral do Atlântico Sul, representando em torno de 24,02% do desembarque total de pescado no Estado do Rio Grande do Sul (BRASIL, 2005). Sendo assim, há grande geração de resíduos deste pescado. Este possui baixo rendimento durante o processo de filetagem produzindo grande quantidade de resíduos. Visando tanto o aspecto ambiental como o econômico, o objetivo deste trabalho foi utilizar os resíduos de pescado como meio de cultivo para a produção de lipase microbiana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada para produção das lipases foram os resíduos de pescado. A espécie corvina (*Micropogonias furnieri*) foi adquirida no mercado público da cidade de Rio Grande, RS, encaminhado em caixa de isopor com gelo até a Planta de processamento de pescados da Universidade Federal de Rio Grande - FURG, local que foi realizado a filetagem. Com a finalidade de obter uma homogeneização do resíduo, constituído de cabeça, vísceras, peles, ossos, escamas, entre outros, o mesmo foi submetido a uma despoldadora. Para o processo fermentativo os resíduos foram diluídos em água destilada esterilizada (121 °C por 20 min) na proporção de 1:5 (pescado:água). O resíduo agroindustrial em questão foi utilizado como fonte de carbono e nitrogênio para a produção de lipases.

Foram realizadas análises químicas com a finalidade de conhecer a composição proximal da matéria-prima. Para tanto, foram realizadas análises de proteína, lipídios, umidade e cinzas, segundo metodologia da AOAC (2010), carboidratos foram determinados por diferença.

2.2 Produção de lipase

Para a produção das lipases foram utilizadas as bactérias, *Bacillus subtilis* e *Corynebacterium aquaticum*. Estas foram mantidas e propagadas em Agar Plate Count. O crescimento dos micro-organismos ocorreu em Frasco de Roux contendo Agar a 35 °C, por um período de 48

h. Posteriormente ao processo de propagação, os micro-organismos foram mantidos refrigerados a 4 °C até sua utilização.

A produção de lipase foi realizada em cultivo submerso por 72 h, em erlenmeyers com e sem chicanas de 500 mL a 200 rpm e 30 °C em shaker orbital. Nesta etapa foram realizados dois planejamentos experimentais 3², analisados com limite de 95% de confiança, sendo que a única diferença entre os planejamentos eram os biorreatores, em um planejamento eram com chicanas e no outro sem chicanas (Tabela 1).

Tabela 1. Planejamento experimental fatorial 3².

Fator	Nível		
	-1	0	1
Fração mássica Resíduos de Pescado (X1)	0,83%	1,66%	2,50%
Micro-organismo (X2)	Bacillus subtilis	Bacillus subtilis + Corynebacterium aquaticum	Corynebacterium aquaticum

O meio de cultivo foi composto por: meio mineral mínimo e os resíduos de pescado. A composição do meio mineral foi: 4 g NH₄NO₃; 4,0822 g KH₂PO₄; 0,0008 g CaCl₂; 10,7182 g Na₂HPO₄; 0,1971 g MgSO₄; 0,0011 g FeSO₄ e 0,0015 g EDTA em 1 L de água destilada (Cooper & Goldenberg, 1987). A fonte de carbono utilizada foi os resíduos de corvina. As bactérias (Bacillus subtilis, Corynebacterium aquaticum e misto das bactérias) foram utilizadas na concentração de 2% e o pH inicial do meio foi 7,0, ajustado com HCl 0,5M.

A atividade lipolítica foi determinada segundo método descrito por Burkert et al. (2004). O método é baseado na titulação com NaOH 0,05N dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase, presente no extrato enzimático do meio fermentativo, sobre os triacilglicerídeos do azeite de oliva emulsionados em goma arábica. A atividade lipolítica foi realizada a cada 24 h, juntamente com um ensaio branco. Os valores de atividade e produtividade enzimática foram definidas pelas Equações 1 e 2:

$$AE = \frac{\Delta V.N.1000}{t.v} \quad (1)$$

$$Prod. = \frac{AE}{Tf} \quad (2)$$

Onde:

AE = Atividade lipolítica (U.mL⁻¹)

ΔV = diferença entre o volume gasto de NaOH para titular amostra e o branco (mL)

N = Normalidade da solução de NaOH

v = Volume de caldo utilizado (mL)

t = tempo de reação (h)

$Prod.$ = Produtividade enzimática (U.mL-1.h-1)

Tf = Tempo de fermentação (h)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição proximal do resíduo de corvina utilizado para a produção de lipase possui valor de umidade de aproximadamente 74% (Tabela 2), este encontra-se próximo do obtido por Bonacina e Queiroz (2007) que foi de 78,7%.

Tabela 2 - Composição proximal dos resíduos de corvina (*Micropogonias furnieri*).

Composição	(%)
Umidade	73,92±0,47
Cinzas	2,38±0,48
Proteínas	18,97±3,25
Lipídeos	4,49±0,47
Carboidratos	0,24±0,00

Avaliando os teores obtidos de proteínas e lipídeos da corvina, foi possível classificar a espécie estudada como concentração intermediária em proteína (15-20%) e baixo conteúdo em gordura (<5%) (Contreras, 1994). A composição proximal da corvina revelou que os valores para a matéria-prima são ligeiramente diferentes dos reportados por Bonacina e Queiroz (2007), que obteve 1,1% gordura, 1,2% de cinzas, mas os teores de proteínas ficaram próximos 18,8% (Tabela 2). A composição proximal do pescado pode variar devido a época do ano, idade, alimentação dos animais e inúmeros outros fatores.

Importante conhecer a composição da matéria prima utilizada como substrato, a fim de verificar a quantidade de carbono e nitrogênio, pois o micro-organismo utilizará, principalmente o carbono e o nitrogênio disponível para produzir o bioproduto desejado.

3.1 Produção de lipase em biorreatores sem chicanas

Os resultados obtidos no planejamento experimental utilizado para avaliar a produção de lipase em biorreatores sem chicanas foram no tempo de 72 h (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados do planejamento para a atividade enzimática e produtividade dos ensaios em biorreatores sem chicanas.

Experimentos	X1	X2	Ativ. Lipolítica (U.mL ⁻¹)	Prod. Enzimática (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹)
1	-1 (0,83%)	-1 (B.S)	12,54	0,17
2	0 (1,66%)	-1 (B.S)	2,65	0,03
3	+1 (2,50%)	-1 (B.S)	5,92	0,08
4	-1 (0,83%)	0 (B.S+C.A)	5,15	0,07
5	0 (1,66%)	0 (B.S+C.A)	7,00	0,10
6	+1 (2,50%)	0 (B.S+C.A)	4,75	0,06
7	-1 (0,83%)	+1 (C.A)	15,91	0,22
8	0 (1,66%)	+1 (C.A)	1,38	0,02
9	+1 (2,50%)	+1 (C.A)	3,30	0,05

X₁=Pescado; X₂= micro-organismo; B.S=*Bacillus subtilis*; C.A=*Corinebacterium aquaticum*;

A atividade lipolítica máxima encontrada para o *Bacillus subtilis* foi de 12,54 U.mL⁻¹ para o ensaio onde foi utilizado a menor concentração de pescado. Utilizando a *Corynebacterium aquaticum* o maior valor de atividade foi de 15,91 U.mL⁻¹, sendo este valor obtido também na menor concentração de pescado (0,83%). Nos experimentos onde foi utilizado o misto de micro-organismo, o melhor resultado foi de 7,00 U.mL⁻¹, o qual corresponde a concentração intermediária de pescado. A produtividade enzimática máxima obtida ocorreu no experimento 7 onde se utilizou 0,83% de pescado e o micro-organismo *Corynebacterium aquaticum*. A menor produtividade foi obtida nos ensaios 2 e 8 onde utilizou-se 1,66% de pescado e *Bacillus subtilis* e *Corynebacterium aquaticum*.

O resultado de atividade lipolítica máxima obtida no trabalho foi de 15,91 U.mL⁻¹, sendo este maior que o valor obtido por Pinheiro et al. (2008), que avaliou a produção de lipase em fermentação submersa por *Penicillium verrucosum*, obtendo uma atividade lipolítica máxima de 3,15 U.mL⁻¹, utilizando com fonte de carbono óleo de oliva.

Vários autores, como Mahadik et al.(2002) e Baron et al. (2005), utilizaram o azeite de oliva como substrato na produção de lipases. Entretanto, o custo da adição de azeite de oliva com fonte de carbono é elevado se for considerada a produção de enzimas em larga escala. Desta forma, pode-se estudar a utilização de outras fontes, como os resíduos agroindustriais, o qual é facilmente obtido, visto que é gerado em grande quantidade na indústria.

Nas Figuras 1 e 2 observa-se que há variação durante o tempo de fermentação sendo que alguns ensaios (2, 4, 6, 8, 9) houve uma queda na atividade lipolítica e conseqüentemente da produtividade ao final da fermentação (Figuras 1 e 2). Em relação a redução da atividade e produtividade, isto ocorre devido às proteases que também são liberadas no meio durante o processo fermentativo e que acabam por hidrolisar as lipases produzidas (BURKERT et al., 2004).

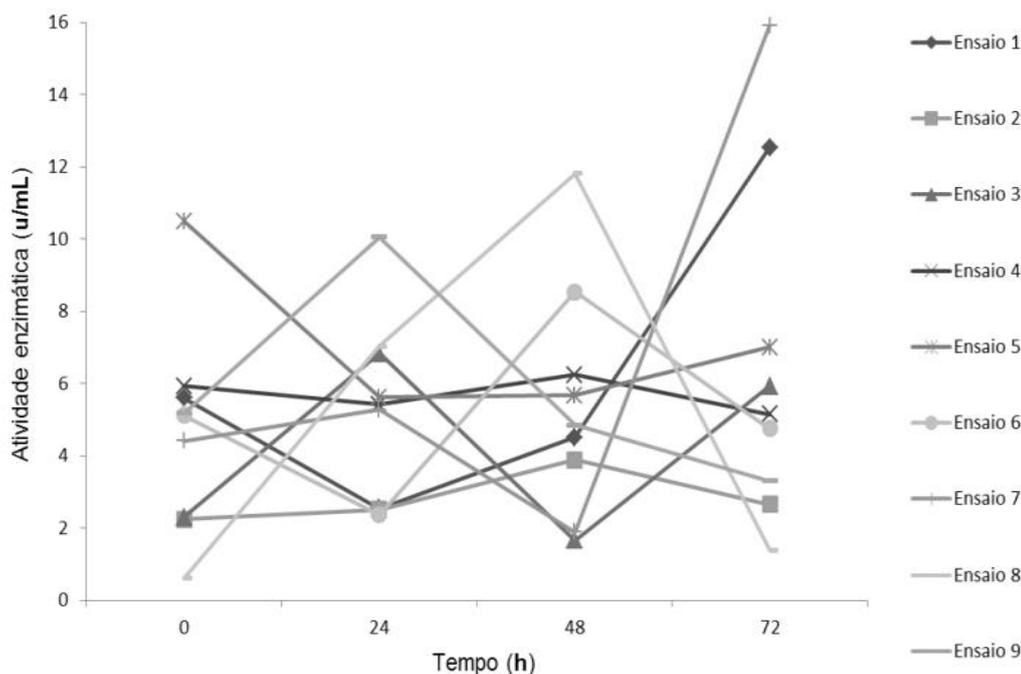


Figura 1 - Atividade enzimática do planejamento com Biorreator sem chicanas

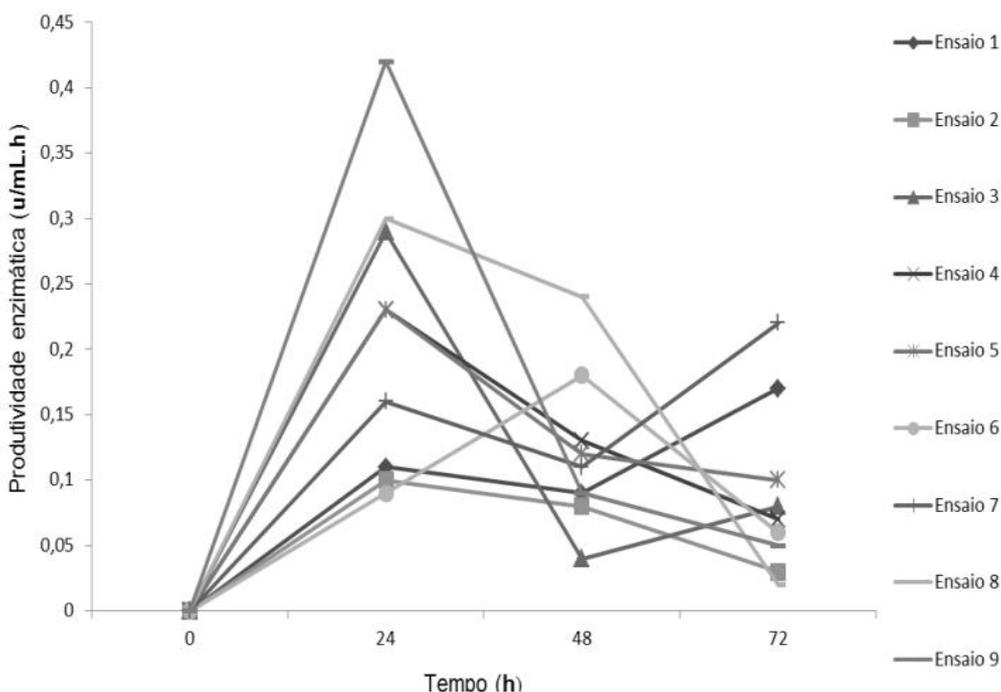


Figura 2 - Produtividade enzimática do planejamento com Biorreator sem chicanas

Padilha et al. (2011) realizaram a produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Pseudomonas cepacia*, 3% de óleo de soja como substrato e as condições de 30 °C, pH 7,0, aeração de 1,5 vvm (volume de ar por volume de meio, por minuto) e agitação de 150 rpm durante 96 h, obtendo como máxima atividade lipolítica 1,85 U.mL⁻¹.

Segundo Padilha et al. (2011), o fator que pode ter afetado os resultados da produção de lipase é o coeficiente de condutividade térmica do meio em que a enzima está exposta,

sendo que este fator influência na inativação enzimática e com isso pode-se obter baixa atividade enzimática, devido ao fato de que algumas enzimas podem perder sua atividade com pequenas variações na temperatura, pois a mudança em sua conformação faz com que seu sítio ativo perca a especificidade de reagir com o substrato. Isso ocorre geralmente devido ao fato de a fermentação submersa possibilitar maior transferência de calor (SINGHANIA et al., 2009).

Fato importante de ressaltar é que os maiores valores de produtividade se encontram no tempo de 24 h e então, é reduzido ao longo do tempo de fermentação (Figura 3). Isso provavelmente ocorre porque durante o processo fermentativo são liberadas proteases, as quais hidrolisam as lipases produzidas e com isso diminui a atividade lipolítica (Burkert et al., 2004), com a redução da atividade ocorre também a queda da produtividade

Os dados de atividade e produtividade foram tratados estatisticamente ao nível de 95% ($p < 0,05$) e os resultados encontram-se na tabela 4.

Tabela 4. Efeitos das variáveis do planejamento experimental na atividade lipolítica e na produtividade em biorreatores sem chicanas

	Atividade Lipolítica (U.mL⁻¹)	P	Produtividade Enzimática (U.mL⁻¹.h⁻¹)	p
Média	2,79	0,49	0,03	0,51
(1) Pescado (L)	-6,54	0,19	-0,09	0,20
Pescado (Q)	8,50	0,29	0,11	0,30
(2) Micro-Organismo (L)	-0,17	0,97	0,01	0,95
Micro-Organismo (Q)	2,63	0,72	0,04	0,72
1L by 2L	-2,99	0,58	-0,04	0,59

L= Efeito linear; Q= Efeito quadrático; p= nível de significância.

Observa-se que nenhum fator influenciou significativamente ($p < 0,05$) a atividade lipolítica e a produtividade enzimática. Somente ao estreitar o intervalo de confiança para 80% para a resposta de atividade lipolítica, observou-se que a variável concentração do pescado (L) (fonte de carbono e nitrogênio) foi a única variável que passou a ser significativa (Tabela 4), portanto, para a produção de lipase com biorreatores sem chicanas, o resíduo de pescado e o micro-organismo não afetaram a atividade lipolítica e a produtividade.

3.2 Produção de lipase em biorreator com chicanas

Na Tabela 5 encontram-se os resultados de atividade lipolítica e produtividade no tempo máximo de fermentação (72h) para os ensaios realizados em biorreatores com chicanas.

Tabela 5. Resultados do planejamento para a atividade enzimática e produtividade dos ensaios em biorreatores com chicanas

Experimentos	X1	X2	Ativ. Lipolítica (U.mL ⁻¹)	Prod. Enzimática (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹)
1	-1	-1	5,79	0,08
2	0	-1	4,62	0,06
3	+1	-1	4,66	0,06
4	-1	0	3,00	0,04
5	0	0	1,18	0,02
6	+1	0	1,88	0,03
7	-1	+1	11,45	0,15
8	0	+1	1,78	0,02
9	+1	+1	2,30	0,03

X₁= % Pescado; X₂= micro-organismo;

Os resultados dos ensaios realizado em biorreator com chicanas foram similares aos obtidos para o ensaio em biorreator sem chicanas, sendo que o melhor resultado para atividade lipolítica encontrada para *Bacillus subtilis* foi de 5,79 U.mL⁻¹ e *Corynebacterium aquaticum* foi de 11,45 U.mL⁻¹, em ambos o melhor resultado foi na condição com a menor concentração de pescado (0,83%). Nos experimentos onde se utilizou o misto de micro-organismos o melhor resultado foi de 1,88 U.mL⁻¹, sendo bem inferior ao obtido com os micro-organismo isoladamente (Tabela 5). A produtividade enzimática máxima foi obtida no experimento 7, onde se utilizou 0,83% de pescado e micro-organismo o *Corynebacterium aquaticum*.

Carvalho (2012) avaliou a co-produção de lipase durante a produção de biossurfactante por bactérias isoladas de um solo contaminado com óleo vegetal residual, sendo utilizado o azeite de oliva como fonte de carbono, os maiores valores de atividade lipolítica obtidos pelo autor foram para linhagens O19, O17 e O45, com 12,4 U.mL⁻¹, 10,00 U.mL⁻¹ e 10,5 U.mL⁻¹, respectivamente. Em algumas linhagens obtiveram valores muito baixos, entre estes destacam-se as linhagens O30 com atividade lipolítica de 0,68 U.mL⁻¹, O57 com atividade de 0,81 U.mL⁻¹ e O7 e O8 com atividade de 0,62 U.mL⁻¹.

Para maioria dos ensaios, os maiores valores de produtividade foram obtidos no tempo de 24 h tendo logo após decaído (Figuras 3 e 4), o mesmo ocorreu para ensaios realizados nos biorreatores sem chicanas. Isso provavelmente ocorre devido que durante o processo são liberados proteases, as quais hidrolisam as lipases produzidas e com isso diminui a atividade lipolítica (BURKERT et al., 2004), com a redução da atividade ocorre também redução da produtividade.

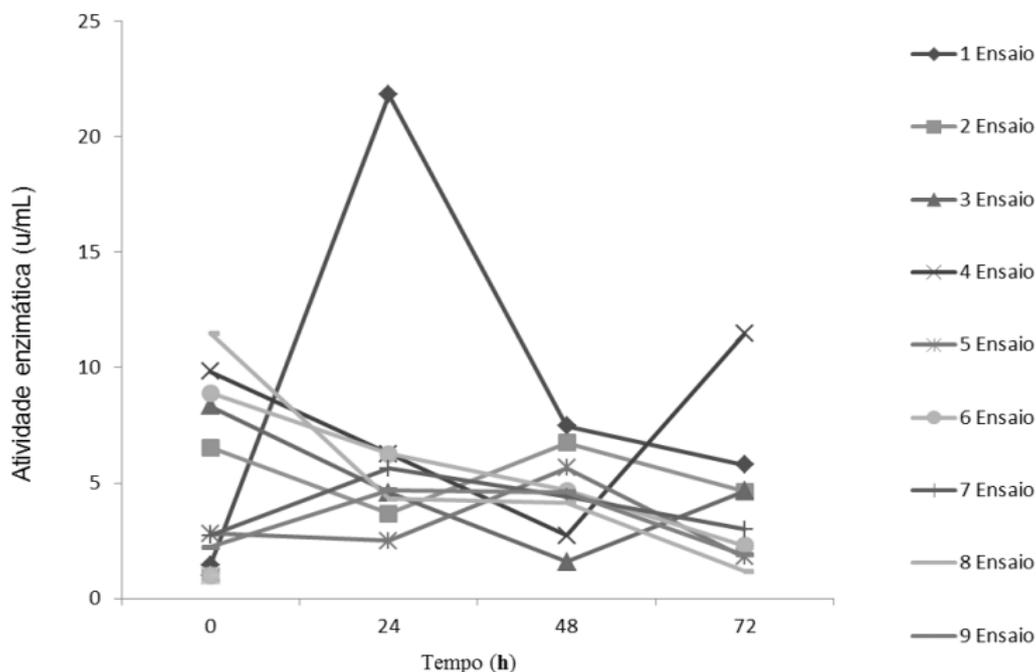


Figura 3 - Atividade enzimática do planejamento com Biorreator com chicanas

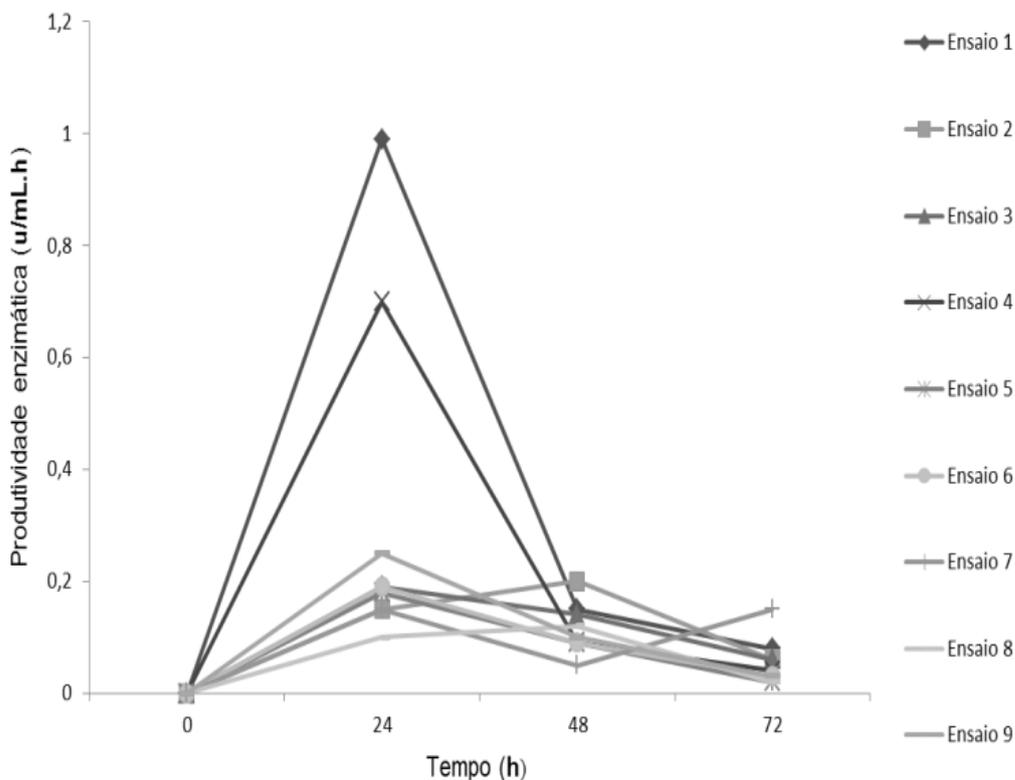


Figura 4 - Produtividade enzimática do planejamento com Biorreator com chicanas

Assim como os dados de atividade e produtividade dos ensaios realizado em biorreatores sem chicanas os dados obtidos em biorreatores com chicanas foram tratados estatisticamente ao nível de 95% ($p < 0,05$) e resultado se encontram-se na tabela 6.

Tabela 6. Efeitos das variáveis do planejamento experimental na atividade lipolítica e na produtividade em biorreatores com chicanas

	Atividade Lipolítica (U.mL⁻¹)	P	Produtividade Enzimática (U.mL⁻¹.h⁻¹)	p
Média	0,47	0,78	0,00	0,71
(1) Pescado (L)	-3,80	0,11	-0,05	0,13
Pescado (Q)	4,64	0,22	0,06	0,23
(2) Micro-Organismo (L)	0,15	0,93	0,00	1,00
Micro-Organismo (Q)	6,16	0,13	0,73	0,18
1L by 2L	-4,01	0,15	-0,05	0,19

L= Efeito linear; Q= Efeito quadrático; p= nível de significância.

Observa-se que nenhum fator influenciou a atividade lipolítica e a produtividade enzimática significativamente ($p < 0,05$) (Tabela 6). Porém, ao estreitar o intervalo de confiança para 80% em relação à produtividade, a interação entre micro-organismo (L) Pescado (L) e micro-organismo (Q) Pescado (L) foram as variáveis que apresentaram significância ($p < 0,20$).

A produção de lipase é amplamente reportada a partir de substratos complexos. De qualquer maneira, a alternativa de uso de substratos alternativos para a produção de lipase microbiana deve ser estudada, pois há possibilidade de redução do custo do processo, além de possuir um grande apelo ambiental, visto que os resíduos de pescados muitas vezes são descartados no próprio meio ambiente, e isso causa um sério problema ambiental.

Uma observação interessante de ressaltar é que os valores obtidos para atividade lipolítica e produtividade enzimática nos biorreatores sem chicanas foram maiores do que os obtidos na fermentação em biorreatores com chicanas. O fator que provavelmente afetou negativamente a produção de lipase foi a aeração, pois dependendo da disposição das chicanas pode ocorrer durante a fermentação zonas de estagnação a qual dificulta a aeração e homogeneização da mistura afetando desta forma a produção de lipase. Autores relatam que a aeração é essencial nesse processo (MARTINS et al., 2008).

4. CONCLUSÕES

A produção de lipase por fermentação submersa foi possível em ambos biorreatores. Porém, o cultivo utilizando biorreatores com chicanas obteve menor atividade lipolítica do que sem chicanas. O melhor resultado em ambos biorreatores foi o ensaio que utilizou a menor concentração de pescado e o micro-organismo *Corynebacterium aquaticum*.

Por fim, as lipases produzidas neste trabalho, além do fato de ser produzida de fonte de baixo custo e de fácil obtenção, poderão ser utilizadas posteriormente no tratamento de

efluentes oleosos, na indústria de detergente, têxteis, cosméticos, biodiesel, biossensores, entre outras aplicações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul – FAPERGS, pelo apoio financeiro; e aos Laboratórios de Tecnologia de Alimentos (LTA) e Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pelo apoio técnico e disponibilidade da estrutura física.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, G. P. S.; MARTINS, V.G.; MARTINS, P. C.; BOSCHERO, R. A.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Influência do meio mineral na produção de biossurfactantes. *Revista de Engenharia e Tecnologia*, 7 (1), 115-122, 2015.

AOAC. Official Methods of Analysis of International. 18th Edition. Washington, DC. USA, 2010.

BONACINA, M.; QUEIROZ, M. I. Elaboração de empanado a partir da corvina (*Micropogonias furnieri*). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 27, n. 3, p. 544-552, Sept. 2007.

BARON, A. M.; TURRA, V.; KRIEGER, N. Produção e caracterização de lipases de *Penicillium corylophilum* IOC 4211. In: Simpósio nacional de fermentações, 15. Recife. Anais. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretária Municipal do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Desembarque de Pescado no Rio Grande do Sul. Rio Grande, IBAMA, 9, 2005.

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

CARVALHO, L.C.T.; DIAS, P. V. S. ; GORLACH-LIRA, K. Produção de lipases por bactérias isoladas de um solo contaminado com óleo vegetal residual. In: 52^o Congresso Brasileiro de Química, Anais. 2012.

CONTRERAS - GUSMÁN, E. S. Bioquímica de Pescado e Derivados. Jaboticabal: Fundação Universidade Estadual Paulista, p.538,1994.

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 53, 224-229, 1987.

DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1042, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 235-251, 2006.

JESUS, M. V. DE; OLIVEIRA, T. S. DE; FERREIRA, R. D. M.; LIMA, A. M. DE; RODRIGUES, J. R. DA S.; SILVA, C. F.; SOUZA, R. R. Produção de lipase utilizando manipueira como fonte alternativa de carbono. *Sci. Plena* 12, 2016.

MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 38, 715-721, 2002.

MARTINS, V.G., KALIL, S.J., COSTA, J.A.V. Lipases and biosurfactant production by solid state fermentation for utilization in bioremediation of vegetable oils and hydrocarbons. *Quím. Nova*, 31, 1942–1947, 2008.

MESSIAS, J.M., COSTA, B.Z. DA, LIMA, V.M.G. DE, GIESE, E.C., DEKKER, R.F.H., BARBOSA, A. DE M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina Ciênc. Exatas E Tecnológicas* 32, 213–234, 2011.

PADILHA, G. S.; FERREIRA, J. F.; CASTIGLIONI, G. L.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. Avaliação da lipase extracelular de *Pseudomonas cepacia* para purificação em sistema bifásico aquoso. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31, 16-21, 2011.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 81-84, 2003.

PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; DOMINGUES, N.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M.; FREIRE, D. M. G. Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 444-450, 2008.

REINEHR, C.O., BORTOLUZZI, L., MORAIS, V.Q. DE, SMANIOTTO, T.M., ZEN, C.K., OLIVEIRA, D. DE, TREICHEL, H., COLLA, L.M. Produção de Lipases com Atividade de Hidrólise por *Aspergillus* Utilizando Subprodutos Agroindustriais, Óleo de Soja e Glicerol. *RECEN - Rev. Ciênc. Exatas E Nat.* 18, 97–115, 2016.

ROVEDA, M., HEMKEMEIER, M., COLLA, L.M. Evaluation of lipase production using different strains of microorganisms isolated from dairy effluent through submerged fermentation. *Food Sci. Technol. Camp.* 30, 126–131, 2010.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44, 13-18, 2009.