



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

USO DE LIPASE FÚNGICA NA REMOÇÃO DE O&G EM EFLUENTES LÁCTEOS

JAÍNE DAIANE DE MOURA

DEZEMBRO / 2020

Toledo – PR



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

USO DE LIPASE FÚNGICA NA REMOÇÃO DE O&G EM EFLUENTES LÁCTEOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Dr. **Mauricio F. Rosa**

Co-orientadora: **Dra. Maria Luiza Fernandes Rodrigues**

DEZEMBRO / 2020

Toledo – PR

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

MOURA, JAÍNE DAIANE DE
USO DE LIPASE FÚNGICA NA REMOÇÃO DE O&G EM EFLUENTES
LÁCTEOS : USO DE LIPASE FÚNGICA NA REMOÇÃO DE O&G EM
EFLUENTES LÁCTEOS / JAÍNE DAIANE DE MOURA; orientador(a),
Maurício Ferreira da Rosa; coorientador(a), Maria Luiza
Fernandes Rodrigues, 2020.
28 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste
do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e
Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Ambientais, 2020.

1. Biorremediação. 2. Enzima. 3. Efluente. I. Rosa,
Maurício Ferreira da. II. Rodrigues, Maria Luiza
Fernandes. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por me conceder o dom da vida.

Aos meus pais, **Jaime e Celita**, por sempre acreditar e nunca desistir de mim, por me acompanhar em meus sonhos e estarem sempre presente em todas as minhas conquistas, sou grata pelo amor e confiança que vocês sempre depositaram em mim, amo vocês eternamente.

Ao meu irmão **Rafael de Moura** que sempre esteve ao meu lado, pois além de irmão, é amigo e sempre será minha inspiração, te amo e obrigada por me apoiar e incentivar em todas as minhas escolhas.

À Mauricio F. da Rosa, meu orientador, agradeço pela disponibilidade, compreensão e conhecimento depositado em mim.

À minha coorientadora Maria Luiza Fernandes Rodrigues, por sua disposição, conhecimento, competência, pelos seus ensinamentos, sua paciência e principalmente por seu acolhimento e sua preocupação em fazer desse trabalho uma referência, além de professora, foi amiga, companheira e um anjo na minha vida, meus sinceros agradecimentos.

À minha colega e amiga Paula G. Gasparin, por aceitar esse desafio de ingressar no mestrado junto comigo, obrigada por todos os momentos de apoio e por sua amizade.

À todos que fizeram parte dessa caminhada, e que de alguma forma ajudaram para se concretizar, seja amigos, colegas, família, professores, obrigada por cada conselho, palavra de apoio e incentivo, minha gratidão e imensa por cada um de vocês.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. METODOLOGIA	14
2.1. PROCEDIMENTOS DE COLETA E ISOLAMENTO DO MICRORGANISMO	14
2.3. SELEÇÃO DE LINHAGEM COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA	14
2.4. ESTOQUE E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS.....	15
2.5. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO UTILIZADO NA FES	15
2.6. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE LIPASES POR FES	15
2.6.1. Determinação da atividade lipolítica	16
2.7. CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE	16
2.8. CINÉTICA DE BIORREMEDIAÇÃO	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1. SELEÇÃO DE LINHAGEM COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA	17
3.2. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO	19
3.3. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE LIPASES POR FES	19
3.4. CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE INCLUI ESTE ITEM.....	21
3.5. CINÉTICA DE BIORREMEDIAÇÃO	22
4. CONCLUSÕES	24
5. REFERÊNCIAS	25

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

% - Porcentagem
 Δt - Variação de tempo
 ΔV - Variação de volume
 μL - microlitro
A - Atividade Enzimática
BDA – Batata Dextrose Agar
BHI - Brain Heart Infusion Broth
cm - Centímetro
DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO - Demanda Química de Oxigênio
Fc - Fator de Correção
FES - Fermentação em Estado Sólido
FOG - Grupo de Substâncias Orgânicas
FS - Fermentação em Estado Submerso
FSG - Farelo de Semente de Girassol
g - Grama
 g L^{-1} - Grama por litro
h - hora
IE - Índice Enzimático
JC - Jéssyca Carvalho
 K_2HPO_4 - Fosfato de potássio dibásico anidro
m - Massa
 mg L^{-1} - Miligrama por litro
 MgSO_4 - Sulfato de magnésio
mL - mililitro
mm - milímetro
mM - milimolar
YPD - Extrato de Levedura Peptona Dextrose
MTCC - Coleção de Cultura do Tipo Microbiana
N - Normalidade
NaOH - Hidróxido de Sódio

nm – Nanômetro

O&G – Óleos e Graxas

pH - Potencial hidrogeniônico

ST - Sólidos Totais

UC - Unidade de Cor

UV - Radiação Ultravioleta

v - volume

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Linhagem JC2017 inoculada em meio BDA, contendo o antibiótico cloridrato de tetraciclina (500 mg L^{-1}), incubada por 14 dias a 28°C18
- Figura 2** - Imagem da câmara de UV. Produção de fluorescência do fungo filamentoso JC2017 (Fonte: De Moura & Carvalho, 2020).....18
- Figura 3** - Cinética de produção de lipase fúngica pelo fungo filamentos JC2017 por FES.....20
- Figura 4** - Cinética de biorremediação enzimática de O&G do efluente de laticínio.....23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição físico-química do farelo da semente girassol (FSG)..	19
Tabela 2 - Caracterização inicial do efluente bruto de indústria de laticínio.....	22
Tabela 3 - Caracterização do efluente de laticínio após o processo de biorremediação.....	22

USO DE LIPASE FÚNGICA NA REMOÇÃO DE O&G EM EFLUENTES LÁCTEOS

[Preparado de acordo com as normas da Revista Journal of Environmental Management]

Jaine Daiane de Moura¹; Jéssyca Ketterine Carvalho²; Cleide Viviane Buzanello Martins³
Maria Luiza Fernandes Rodrigues⁴; Mauricio Ferreira da Rosa⁵.

RESUMO

Os óleos e graxas (O&G) representam uma classe de poluentes com baixa afinidade com a água nos setores de produção de produtos lácteos. Buscar alternativas inovadoras de tratamento representa uma contribuição significativa para a sustentabilidade operacional e econômica no setor de laticínios. A biorremediação enzimática, pelo uso de biocatalisadores como as lipases, tem mostrado potencial promissor. As lipases são catalisadores versáteis com aplicação aprimorada na biotecnologia, por se tratar de uma tecnologia limpa (*white biotechnology*), onde as condições de reação são brandas, sua alta enantiosseletividade e regioseletividade e fácil disponibilidade. Essas enzimas apresentam uma importância particular pelo fato de hidrolisarem especificamente óleos e graxas (O&G), o que pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é utilizar a lipase fúngica, produzida por Fermentação em Estado Sólido (FES), na biorremediação de efluentes com alta carga de gorduras, resultantes do processamento de laticínios. O microrganismo utilizado neste trabalho é uma linhagem de fungo filamentososo, denominado JC2017, isolado do rio Toledo, na Cidade de Toledo-PR. A lipase foi produzida por FES utilizando farelo de semente de girassol (*Helianthus annuus*) como substrato, com granulometria do entre 10 e 16 mesh, 55% umidade, 10^8 esporos por grama a 28 °C. A lipase produzida por FES foi utilizada nos experimentos de biorremediação (shaker a 150 rpm, 37 °C e 168 horas) para redução de O&G de um efluente de laticínio de Marechal Candido Rondon-PR. Nos experimentos de FES, nota-se que a maior atividade lipolítica (210,2 U) foi obtida após 96 horas de fermentação. Nos experimentos de biorremediação, obteve-se uma redução de 91,6 % de O&G no efluente de laticínio utilizado. Diante dos resultados, verificou-se neste trabalho um tratamento eficiente onde águas residuárias da indústria de produtos lácteos poderão ser utilizadas para fins de reuso no processo industrial e minimizar a geração de efluentes nas estações de tratamento da indústria de produtos lácteos.

Palavras-chave: Biorremediação; Enzima; Efluente.

ABSTRACT

Oils and greases (O&G) represent a class of pollutants with low affinity for water in the sectors of production of dairy products. Seeking innovative treatment alternatives represents a significant contribution to operational and economic sustainability in the dairy sector. The enzymatic bioremediation, through the use of biocatalysts such as lipases, has shown promising potential. Lipases are versatile catalysts with improved application in biotechnology, since it is a clean technology (*white biotechnology*), where the reaction conditions are mild, their high enantioselectivity and regioselectivity and easy availability. These enzymes are of particular importance because they specifically hydrolyze oils and greases (O&G), which can be of great interest for the treatment of effluents. In this context, the objective of this work is to use fungal lipase, produced by Solid State Fermentation (FES), in the bioremediation of effluents with a high fat load, resulting from dairy processing. The microorganism used in this work is a strain of filamentous fungus, called JC2017, isolated from the Toledo River, in the City of Toledo-PR. The lipase was produced by FES using sunflower seed bran (*Helianthus annuus*) as substrate, with a particle size of between 10 and 16 mesh, 55% humidity, 10^8 spores per gram at 28 ° C. The lipase produced by FES was used in the bioremediation experiments (shaker at 150 rpm, 37 °C and 168 hours) to reduce the O&G of a dairy effluent from Marechal Candido Rondon-PR. In the FES experiments, it is noted that the highest lipolytic activity (210.2 U) was obtained after 96 hours of fermentation. In the bioremediation experiments, a reduction of 91.6% in O&G was obtained in the dairy effluent used. In view of the results, this work showed an efficient treatment where wastewater from the dairy industry can be used for the purpose of reuse in the industrial process and minimize the generation of effluents in the dairy industry treatment plants.

Keywords: Bioremediation; Enzyme; Effluent.

1. INTRODUÇÃO

O setor lácteo encontra-se em expansão no Brasil, porém, na atual situação de escassez no abastecimento de água, esse cenário poderá representar um problema futuro para estas indústrias, uma vez que as mesmas consomem grandes volumes de água para o processamento de seus produtos e higienização dos equipamentos.

O Brasil é o quarto maior produtor de leite do mundo, com uma estimativa de produção de mais de 34,3 bilhões de litros (WORLD ATLAS, 2018). Entretanto, o grande volume de água necessário para produzir produtos lácteos coloca a indústria de laticínios como uma das principais geradoras de efluentes. A água residual de laticínios é basicamente composta de carboidratos (lactose), proteínas e gorduras. Assim, é caracterizado por grande quantidade de moléculas orgânicas, gorduras, óleos e graxas (FOG), juntamente com leite sólidos, detergentes, desinfetantes, resíduos de leite, dentre outros (ADULKAR & RATHOD, 2014).

Entre os poluentes encontrados em águas residuais das indústrias de produtos lácteos merece atenção os FOG, um grupo de substâncias orgânicas de alto peso molecular e baixo coeficiente de biodegradabilidade, e de difícil remoção por tratamentos convencionais (PINTOR *et al.*, 2016). Diante da problemática da geração de elevadas proporção de efluente pelas indústrias de laticínios, é inevitável buscar métodos corretamente ecológicos para a tratabilidade e redução do teor lipídico nesses efluentes.

A exploração de biorremediação enzimática, pelo uso de biocatalisadores como as lipases, tem mostrado potencial promissor. As lipases são catalisadores versáteis com aplicação aprimorada na biotecnologia, por se tratar de uma tecnologia limpa (*white biotechnology*), onde as condições de reação são brandas, sua alta especificidade e fácil disponibilidade. Essas enzimas apresentam uma importância particular pelo fato de hidrolisarem especificamente óleos e gorduras, o que pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes, o que possibilita remover filmes oleosos em tubulações, resultando no aumento da vida útil dos equipamentos (VALENTE *et al.*, 2010; FURINI *et al.*, 2018).

As lipases são enzimas que pertencem à família α/β hidrolase (KAPOOR & GUPTA, 2012; PRIJI *et al.*, 2014), não precisam de um cofator para sua atividade e permanecem ativas em solventes orgânicos (LEE *et al.*, 2015). O elevado rendimento em meio aquoso e orgânico, o reduzido tempo reacional, a estabilidade frente ao pH e temperatura são algumas das propriedades que tornam as lipases os biocatalisadores mais utilizados industrialmente (THAKUR, TEWARI & SHARMA, 2014; ASHFAQ, 2015).

As lipases podem ser de origem vegetal, animal e microbiana. Atualmente as lipases

microbianas têm sido muito utilizadas nas pesquisas, pois apresentam vantagens de catalisar diversas reações, produzir altos rendimentos, reduzir custos de produção, relativa facilidade de manipulação genética, são estruturalmente estáveis em solventes orgânicos, independem dos cofatores, catalisam reações utilizando uma ampla gama de substratos e possuem alta enantiosseletividade (CARVALHO *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2015; JAVED *et al.*, 2018; ZAITSEV, SAVINA & ZAITSEV, 2019).

As lipases são naturalmente encontradas nos tecidos de animais, principalmente no pâncreas, de onde inicialmente eram obtidas; em plantas como a mamona (*Ricinus communis*) e a canola (*Brassica napus*) e, em microrganismos, como fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo os gêneros *Rhizopus*, *Candida*, *Penicillium* e *Pseudomonas* considerados as principais fontes produtoras desta enzima (JAEGER, 1998; LAGE *et al.*, 2016).

Os gêneros de fungos filamentosos *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Trichoderma* são descritos como bons produtores de lipases, e podem ser isolados a partir do solo, água, frutos, plantas, dentre outros (CORTEZ, CASTRO & ANDRADE, 2016). As espécies de *Penicillium* são amplamente utilizadas em indústrias de laticínios e em processos de bioconversão de importância industrial (MAROTTI *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2019).

Estima-se que atualmente a produção e venda mundial de lipases seja de cerca de 10% de todas as enzimas comercializadas. A aplicação na indústria de alimentos, bebidas e ração animal representa cerca de 55% das lipases comercializadas (GUERRAND, 2017; POHANKA, 2019).

As enzimas podem ser produzidas por duas rotas de fermentação, sendo uma em estado sólido (FES) e a outra por estado submerso (FS) (VALENTE *et al.*, 2010).

As enzimas de interesse industrial, como as lipases, podem ser obtidas por FES, por meio do uso de resíduos agroindustriais, como substrato ou suporte de crescimento para os microrganismos, reduzindo assim o custo da produção (MENONCIN *et al.*, 2010) ou por FS, na qual os microrganismos crescem em meio líquido, com alto teor de água livre. Independente do processo de fermentação, a produção de lipases está relacionada à composição do meio de cultivo e condições de fermentação.

Uma alternativa que visa reduzir os custos de produção de enzimas é a FES, que é uma tecnologia promissora para produção de enzimas, pois além de usar substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, o biocatalisador pode ser produzido de forma mais concentrada, facilitando a sua recuperação do meio de cultivo, quando necessário.

Objetiva-se com este trabalho utilizar o fungo, isolado do Rio Toledo-PR, na produção de lipase por Fermentação em Estado Sólido (FES) e na aplicação do biocatalisador na biorremediação de efluentes com alta carga de gorduras, resultantes da produção de laticínios.

2. METODOLOGIA

O microrganismo que foi utilizado neste trabalho é uma linhagem de fungo filamentosos, denominado JC2017, isolado do Rio Toledo, na Cidade de Toledo-PR.

2.1. PROCEDIMENTOS DE COLETA E ISOLAMENTO DO MICRORGANISMO

O fungo filamentosos, denominado JC2017, foi obtido através de amostras coletadas no Rio Toledo, localizado na cidade de Toledo, Paraná, na coordenada geográfica 24°45'10.86" S 53°45'3.52" O, em perímetro urbano da cidade de Toledo, próximo ao contorno Sul da Cidade, tendo pouca atividade agrícola e uma mata preservada significativa ao redor.

Foram coletados 200 mL de água em frascos esterilizados com tampa. Os frascos foram submersos a 30 cm da superfície e a uma distância aproximada de 2 metros da margem nos dois pontos. Foram aferidos pH e temperatura com uma sonda multiparâmetro (AAKER). Após o término do procedimento, os frascos foram acondicionados em caixa térmica com gelo, até seu transporte para a universidade.

Alíquotas de 250 µL da amostra foram semeadas por métodos de espalhamento em superfície em placas de Petri com meio BDA (ágar batata dextrose) suplementado com 0,05% de cloranfenicol e 0,05% de cloridrato de tetraciclina para inibir crescimento bacteriano. As placas já contendo o material inoculado foram incubadas a temperatura de 28°C por 14 dias.

O fungo filamentosos selecionado, foi novamente isolado em placas em mesmo meio de BDA para obtenção da cultura pura, cada cultura isolada recebeu a denominação JC seguido de uma numeração sequencial.

2.3. SELEÇÃO DE LINHAGEM COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Para verificar se a linhagem fúngica produz lipases, foram realizados testes em placas de Petri com meio ágar bacteriológico contendo o corante Rodamina B 0,001%, óleo de oliva 1% (indutor na produção de lipases), $MgSO_4$ 0,2 g L⁻¹; K_2HPO_4 0,4 g L⁻¹; extrato de levedura 2,0 g L⁻¹ e Tween 80 0,01%. A produção de lipase em placas de Petri foi confirmada pela presença de halos alaranjados, fosforescentes ao UV quando observado ao ultravioleta a 350 nm, após 72 horas de incubação em estufa a 28°C (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A atividade enzimática dos isolados foram estimadas mediante a equação 1, da relação entre diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia conforme Ten *et al.*, (2004), medidas com o auxílio de um paquímetro e anotadas (mm).

$$IE = \frac{\text{DIÂMETRO MÉDIO DO HALO DE DEGRADAÇÃO}}{\text{DIÂMETRO MÉDIO DE CRESCIMENTO MICROBIANO}} \quad \text{Eq. (1)}$$

2.4. ESTOQUE E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS

A linhagem JC2017 foi inoculada em meio BDA, contendo 0,05% de cloranfenicol e 0,05% de cloridrato de tetraciclina e incubada por 14 dias a 28°C, sendo após o crescimento mantidas sob refrigeração (4°C).

2.5. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO UTILIZADO NA FES

A composição centesimal do substrato (sementes de girassol), como umidade, cinzas e teor de óleo foi determinada de acordo com os métodos AOAC (2005). As determinações foram realizadas em triplicata sendo expressas pela média e desvio padrão.

2.6. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE LIPASES POR FES

Foi utilizado como substrato para a FES, material com alto valor lipídico, como a sementes de girassol (*Helianthus annuus*). A semente de girassol foi obtida em um comércio local de Toledo-PR (24°42'50"S 53°44'34"O).

Este substrato foi seco em estufa à 50 °C, processado através de peneiramento e separação das granulometrias entre 2,0 e 1,19 mm (RODRIGUES *et al.*, 2015). O material tamisado e separado ainda fresco, foi armazenado em embalagens plásticas e devidamente acondicionados em um refrigerador.

A lipase foi produzida por FES utilizando farelo de semente de girassol como substrato. Os ensaios de FES foram realizados conforme metodologia descrita por RODRIGUES *et al.* (2015). Para a FES, foi realizado um estudo cinético de 0 à 168 horas, com 10,0 g de farelo de semente de girassol com granulometrias entre 1,19 mm (16 Mesh) e 2,0 mm (10 Mesh), umidade de 55% (tampão fosfato 50 mM pH 7,0), 10⁸ esporos por grama, 28°C. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A produção de lipase foi acompanhada pela dosagem da atividade lipolítica pelo método titulométrico no material fermentado (0 a 168 horas), segundo RODRIGUES *et al.* (2015). A atividade lipolítica é expressa como unidades de atividade enzimática (U).

A cada 24 horas foram retiradas amostras em triplicata e os sólidos fermentados foram

congelados a 0°C por 24 horas para interromper o crescimento fúngico. Após esse período, foram secos em estufa com circulação de ar (30°C), acondicionados em embalagens plásticas e armazenados na geladeira, para determinação da atividade lipolítica, segundo o item 2.6.1.

2.6.1. Determinação da atividade lipolítica

O óleo de oliva foi utilizado como substrato para os ensaios de atividade frente à triacilgliceróis. A determinação da atividade de lipases por titulometria foi baseada num método de titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis (RODRIGUES *et al.*, 2015).

O meio reacional para o substrato foi previamente preparado na forma de emulsão. A emulsão é composta por solução de tampão fosfato 50 mM pH 7,0, goma arábica 10% e pelo substrato óleo de oliva (1,0 mM ou 7,15 % m/v). Mediu-se o pH da emulsão e corrigiu para 7,0 (com NaOH 50 mM). Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 125 mL, adicionando-se 20 mL da emulsão e 1,0 g do sólido fermentado, contendo a enzima.

As amostras foram incubadas em Shaker, sob agitação, por 20 minutos a 37 °C. A reação foi paralisada adicionando-se 20 mL de solução de etanol/acetona (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados em solução de NaOH (50 mM) até pH próximo de 10. A atividade lipolítica foi determinada segundo a Equação (2).

Cálculo da Atividade

$$A = \frac{[(\Delta V / \Delta t)] \times [N(\text{NaOH})] \times Fc \times (60 \text{ seg})}{1000 \text{ mL} \times 1 \text{ min}} \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde :

A : Atividade Enzimática (U/gSS – Unidades por grama de substrato seco)

ΔV : Variação dos volumes obtidos em cada tempo de fermentação

Δt : Variação do tempo das fermentações realizadas

N : Normalidade da solução de hidróxido de sódio

Fc : Fator de correção obtido da padronização da base

2.7. CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

O efluente utilizado neste estudo foi cedido por uma indústria de laticínios da Cidade de Marechal Cândido Rondon-PR (24°33'24"S 54°3'24"O). A amostra do efluente foi coletada na entrada do tratamento de efluentes, onde sua composição é de origem de produção e limpeza

da indústria.

Os principais produtos desta empresa são queijo mussarela, prato, provolone, minas frescal, coalho, ricota, colonial e a manteiga.

Para a caracterização do efluente, foram realizadas análises físico-químicas no efluente bruto gerado na indústria de laticínio e após o processo de biorremediação, quanto aos parâmetros de demanda química de oxigênio (DQO); sólidos totais (ST); pH; determinação de óleos e graxas totais (O&G) (APHA, 2012).

2.8. CINÉTICA DE BIORREMEDIAÇÃO

Para os estudos de biorremediação foram utilizados o sólido fermentado contendo a lipase por adição direta.

Nestes experimentos, a enzima foi produzida nas melhores condições por FES, com o farelo de semente de girassol, realizada com 55 % de umidade, granulometria entre 2,0 e 1,19 mm e 10^8 esporos g^{-1} .

Nos ensaios de biorremediação, utilizou-se 26 g do sólido fermentado (546,52 U) em 1000 mL do efluente de laticínio de Marechal Candido Rondon-PR, sendo que os experimentos foram realizados em duplicata. A cinética de biorremediação foi observada até uma redução acima de 90 % de O&G (168 horas), retirando-se amostras a cada 24 horas. As reações de biorremediação foram realizadas em *shaker*, 150 rpm e 37 °C, com objetivo de reduzir O&G. Para cada ponto determinou-se os valores de óleos e graxas totais ($O\&G_T$), segundo a metodologia de APHA (2012) método 5520D.

Para a caracterização do efluente após a biorremediação foram realizadas análises físico-químicas quanto aos parâmetros de demanda química de oxigênio (DQO); sólidos totais (ST); pH; determinação de óleos e graxas totais (APHA, 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. SELEÇÃO DE LINHAGEM COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Para verificar se a linhagem fúngica JC2017 (Figura 1) é produtora de lipase, foram realizados testes em duas etapas: a primeira em placas de Petri (Figura 2) e uma segunda etapa, realizou-se a FES e acompanhou-se a atividade enzimática pelo método titulométrico (item 2.6.1).



Figura 1. Linhagem JC2017 inoculada em meio BDA, contendo o antibiótico cloridrato de tetraciclina (500 mg L^{-1}), incubada por 14 dias a 28°C .

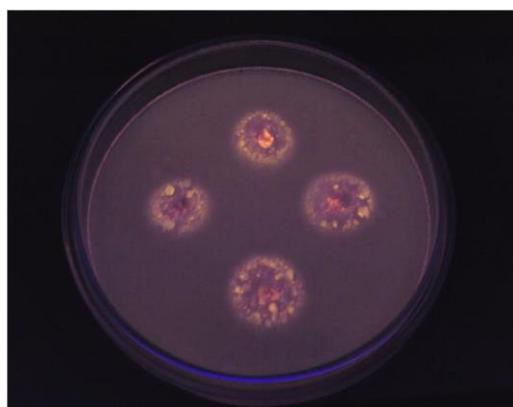


Figura 2. Imagem da câmara de UV. Produção de fluorescência do fungo filamentososo JC2017 (Fonte: De Moura & Carvalho, 2020).

A produção de lipase, pelo fungo filamentososo JC2017, em placas de Petri foi confirmada pela presença de halos alaranjados, fluorescentes ao UV, após 72 horas de incubação em estufa a 28°C (Figura 2). A lipase produzida pelo fungo filamentososo JC2017 apresentou um índice enzimático (IE) de 2,0, calculado segundo a equação 1. A atividade enzimática foi estimada mediante relação entre diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia. O diâmetro do halo de hidrólise é considerado um parâmetro para auxiliar na seleção das linhagens com maior índice de degradação, sendo considerado uma medida mais rápida e simples (TEN *et al.*, 2004). Diante disso, foi considerado que o microrganismo é bom produtor enzimático para aplicação industrial quando “IE” $\geq 2,0$.

Após realizados estes testes preliminares, a linhagem fúngica foi utilizada para a produção de lipase por FES, segundo RODRIGUES *et al.* (2015).

3.2. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO

A composição físico-química do farelo de semente de girassol (FSG) está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição físico-química do farelo da semente girassol (FSG).

PARÂMETRO	VALOR MÉDIO (%)
Cinzas	3,51% ± 0,34
Umidade	4,44% ± 0,17
Teor de óleo	48,9% ± 0,12

Ao analisar os resultados da Tabela 1, verifica-se que o teor de óleo do FSG é elevado (48,9%). Este valor está de acordo com a literatura. Segundo Premnath *et al.* (2016), o teor de óleo nas sementes de girassol varia de 35,0 a 42,0 %. Leite, Brighenti & Castro (2005), obtiveram um teor de 47,3 %, semelhante ao obtido neste trabalho.

A umidade obtida neste trabalho (4,44 %) também está de acordo com a literatura. Leite, Brighenti & Castro (2005), obtiveram um teor de umidade de 4,8 %, valor próximo ao obtido neste trabalho. Conhecendo-se a umidade do substrato, pode-se ajustar a umidade disponível durante a fermentação de modo a favorecê-la.

O FSG foi utilizado como substrato para a produção de lipases fúngicas por FES. Este substrato é viável e de fácil obtenção, se tornando uma opção para a FES e produção de enzimas, uma vez que a FSG servirá como fonte de lipídios, que induzem a produção de lipases.

Outras vantagens do uso do girassol é que o próprio material fermentado pode ser utilizado como suporte para a enzima, sem a necessidade de imobilizá-la em suportes como a Silica e o Accurel, sendo possível utilizar diretamente o sólido fermentado no meio reacional, como será demonstrado em experimentos posteriores de biorremediação neste trabalho.

Após determinar a composição físico-química dos substratos, realizou-se então um estudo cinético de fermentação para o substrato girassol.

3.3. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE LIPASES POR FES

Avaliou-se a cinética de produção de lipases pelo fungo filamentosso denominado JC2017, utilizando-se farelo de semente de girassol (FSG) como substrato, durante 0 à 168 horas de fermentação, a 28 °C, 55 % de umidade e granulometria do substrato entre 10 Mesh (2 mm) e 16 Mesh (1,19 mm). Os resultados da cinética de produção de lipases estão

apresentados na Figura 3.

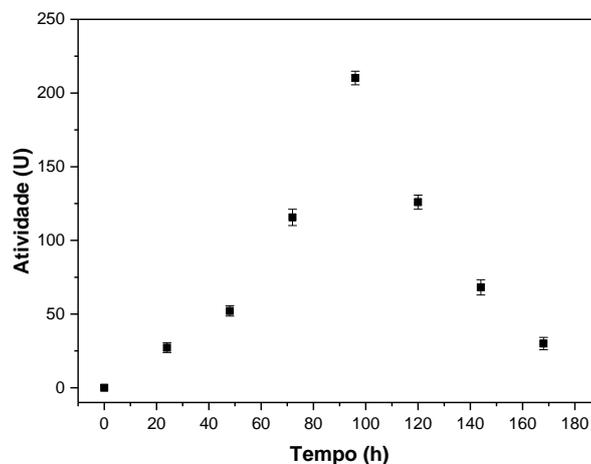


Figura 3- Cinética de produção de lipase fúngica pelo fungo filamentos JC2017 por FES.

Os resultados demonstraram que inicialmente houve um aumento de atividade lipolítica com o tempo de fermentação devido ao maior crescimento do microrganismo em fase exponencial e maior disponibilidade de substrato. A maior atividade lipolítica (210,2 U) foi obtida após 96 horas de fermentação.

Analisando-se o teor dos óleos presentes no substrato FSG neste trabalho, no início da FES e no pico de produção de lipases (96 horas), verificou-se que no início da fermentação o valor era de 48,87 % e após 96 horas de fermentação, o valor reduziu para 12,5 % (AOAC, 2005).

Após, nota-se uma diminuição dos valores de atividade lipolítica, provavelmente devido à diminuição da fonte de carbono dos óleos presentes no substrato. A queda na atividade lipolítica ocorre provavelmente porque o fungo começa a produzir proteases para processar as outras fontes de carbono menos abundantes. Essas proteases são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas presentes em proteínas e outras enzimas, desnaturando e diminuindo a concentração de lipases (DALMAU *et al.*, 2000; KANMANI *et al.*, 2014).

A FES apresenta uma série de vantagens para o cultivo de fungos, pois além de fornecer os nutrientes para o desenvolvimento microbiano ainda apresenta um ambiente ideal para o crescimento. O ambiente sólido e úmido favorece o crescimento micelial, pois os fungos geralmente necessitam de uma superfície a qual possam se aderir (BARRIOS- GONZÁLES, 2012).

Entre todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água apresenta

papel de destaque na FES em virtude do elevado grau de interação com os componentes sólidos, sendo que não há líquido livre no sistema (PANDEY *et al.*, 1999).

O teor de umidade pode influenciar o estado físico do substrato, a disponibilidade e a difusão de nutrientes e a troca de oxigênio e de CO₂ no meio. O elevado teor de umidade inicial pode afetar o crescimento do microrganismo, pois a porosidade do meio e a difusão de oxigênio são reduzidas, dificultando a formação do produto. Por outro lado, em baixos teores de umidade inicial, a produção enzimática também pode ser reduzida porque o fungo sofre modificações na membrana celular, conduzindo a limitações de transporte e afetando o metabolismo microbiano.

Quando a fermentação é conduzida com um alto índice de água livre, com uma umidade superior a 70%, permitindo que o fungo se desenvolva no interior da matriz de particulados do substrato, a fermentação será dita como submersa (BINOD *et al.*, 2015). Caso a fermentação ocorra com um índice reduzido de água livre no substrato, umidade inferior a 65%, fazendo com que o fungo se desenvolva sobre o material, sem adentrar completamente os poros nos sólidos, a fermentação será caracterizada como fermentação em estado sólido (BINOD *et al.*, 2015). Neste trabalho utilizou-se uma umidade de 55 %, baseado na literatura (Rodrigues *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos neste trabalho (210,2 U) são semelhantes aos obtido por Kruger (2017), que realizou estudos de produção de lipases de *Penicillium sumatrense* por FES através de um delineamento fatorial 2² utilizando-se a torta de crambe (*Crambe abyssinica hochst*) como substrato. Os melhores resultados foram obtidos com a granulometria de 28 Mesh, umidade de 60 % e temperatura de 27 °C. A maior atividade lipolítica (243 U) foi obtida após 96 horas de fermentação.

Os resultados obtidos nesta pesquisa também são semelhantes aos obtidos por Oliveira (2013), que utilizou a FES para obtenção de lipases de *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus*. Os melhores resultados foram obtidos com umidade de 65 %, 30 °C e 72 horas de fermentação. A cepa de *P. sumatrense* produziu 318,3 U em 10 g de sólido fermentado (FSG), enquanto que *A. fumigatus* produziu 227,3 U, nas mesmas condições de cultivo.

3.4. CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE INCLUI ESTE ITEM

Os resultados obtidos na caracterização do efluente bruto de indústria de laticínio são descritos na Tabela 2.

Tabela 2- Caracterização inicial do efluente bruto de indústria de laticínio.

Parâmetros	Unidades	Valor Médio	Padrão Conama
O&G	mg L ⁻¹	2517,3 ± 25,82	50,0
pH	-----	5,26 ± 0,130	5,0-9,0
ST	mg L ⁻¹	3232,0 ± 12,0	-----
DQO	mg de O ₂ L ⁻¹	3163,7 ± 18,0	-----

Legenda: O&G (óleos e graxas); pH (potencial hidrogeniônico); ST (sólidos totais); DQO (demanda química de oxigênio).

Apenas o valor de pH apresentou-se dentro dos parâmetros estabelecidos pela resolução CONAMA nº 430\2011, sendo necessária a correção nos valores de DQO, sólidos totais, óleos e graxas (CONAMA, 2011), para reutilização ou lançamento do efluente em corpos hídricos.

3.5. CINÉTICA DE BIORREMEDIAÇÃO

Os valores obtidos na caracterização do efluente de laticínio, após o processo de biorremediação, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3- Caracterização do efluente de laticínio após o processo de biorremediação.

Parâmetros	Unidades	Valor Médio
O&G	mg L ⁻¹	210,6 ± 10,28
pH	-----	6,20 ± 0,200
ST	mg L ⁻¹	2859,00 ± 7,88
DQO	mg de O ₂ L ⁻¹	2950,00 ± 10,5

Legenda: O&G (óleos e graxas); pH (potencial hidrogeniônico); ST (sólidos totais); DQO (demanda química de oxigênio).

Os resultados demonstraram que houve uma redução de O&G, sendo que ST, DQO e pH sofreram pequena variação.

A busca de alternativas inovadoras de tratamento representa uma contribuição significativa para a sustentabilidade operacional e econômica no setor de laticínios. Neste

contexto, o pré-tratamento de águas residuais ricas em gorduras por biorremediação utilizando biocatalisadores como lipase de natureza fúngica poderá ser uma alternativa promissora, pois a produção da enzima é de baixo custo e apresentam as vantagens de biodegradabilidade (*white biotechnology*) e pode ser recuperada e utilizada em reciclo, reduzindo o custo operacional. Entretanto, o processo de biorremediação quando realizado deverá ter em sua sequência um tratamento de polimento, como é o caso do efluente das indústrias de produtos lácteos, o qual possui também em sua composição íons metálicos e matéria orgânica presente. Desta forma, coagulação/floculação poderá ser realizada como processo sequencial a biorremediação.

Com relação aos experimentos de biorremediação, o parâmetro O&G, que é o objetivo deste trabalho, demonstrou o comportamento observado pela Figura 4.

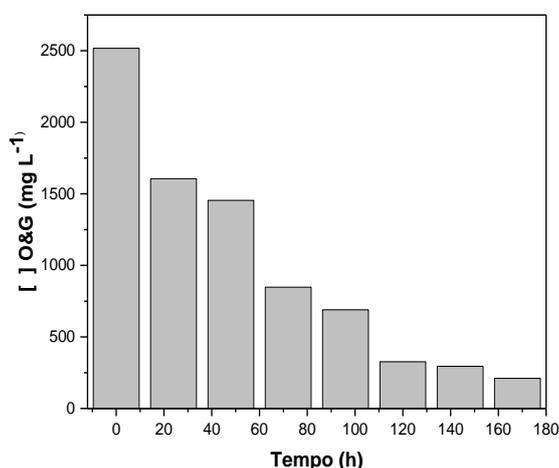


Figura 4- Cinética de biorremediação enzimática de O&G do efluente de laticínio.

Na reação enzimática de hidrólise, os substratos são os óleos e graxas presentes no efluente, que possui alto teor lipídico ($2517,3 \pm 25,82 \text{ mg L}^{-1}$). Ao final de 168 horas de biorremediação, a concentração de O&G foi de $210,6 \pm 10,28 \text{ mg L}^{-1}$, uma redução de 91,63%.

Durli (2007) produziu lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11, por FES e empregou-a no tratamento de efluentes de indústria de laticínio, com o objetivo de reduzir o teor de gordura contida no efluente. Estudos foram realizados adicionando-se o sólido fermentado e seco diretamente nas amostras de efluentes autoclavadas (348 mgL^{-1} O&G). O estudo foi realizado utilizando-se delineamento fatorial incompleto, com três variáveis (temperatura, pH e atividade enzimática adicionada no efluente). A máxima remoção de O&G prevista pelo modelo foi de 60% após 72 horas de incubação, nas condições de 29 a 32 °C, pH 8,0 a 9,2 e atividade enzimática adicionada no efluente de $47,2 \text{ U L}^{-1}$.

Alberton *et al.* (2010) produziram lipases de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07DRM, por FES e empregou-a no tratamento de efluentes de indústria de laticínio, com o objetivo de reduzir o teor de gordura contida no efluente. Estudos foram realizados adicionando-se o sólido fermentado e seco diretamente nas amostras de efluentes (1300 mgL^{-1} O&G). Após 72 horas de incubação à $35 \text{ }^\circ\text{C}$, a concentração de O&G reduziu para 300 mgL^{-1} (76,92% redução).

A utilização do tratamento enzimático em efluentes com alto teor de óleos e graxas (O&G) reduz os níveis de sólidos suspensos e lipídeos, conforme verificado na Tabela 3, o que possibilita melhores condições de operação no tratamento anaeróbio e desobstrui filmes de óleos em tubulações, resultando no aumento da vida útil dos equipamentos (MENDES & CASTRO, 2005). Além disso, esse tratamento apresenta algumas vantagens, tais como a especificidade da enzima com relação ao substrato, o que permite controlar os produtos, o que leva a um aumento dos rendimentos pela não geração de subprodutos tóxicos; condições moderadas de operação, redução do custo em termos de energia e de equipamentos, tornando este processo atrativo sob o ponto de vista ambiental (MENDES & CASTRO, 2005).

Segundo a resolução nº 430/2011 do CONAMA, para que ocorra o descarte de efluentes em rios, é necessário que o seu valor seja igual ou inferior a 50 mg L^{-1} . Apesar da redução de O&G no processo de biorremediação ser elevada (91,63 %), os resultados obtidos neste estudo ainda não estão de acordo com os valores do CONAMA 2011, sendo necessária uma redução de 98% de O&G para atingir os valores da resolução do CONAMA.

4. CONCLUSÕES

Verificou-se que o fungo filamentososo, isolado do Rio Toledo-PR, produziu lipase com pico máximo de produção em 96 horas de fermentação (210,2 U).

A lipase produzida por FES foi eficiente no processo de redução de O&G, com uma redução de 91,63 % no efluente de laticínio.

Estes resultados sugerem que o tratamento prévio do efluente de laticínio foi eficiente, mas que é necessário na sequência um tratamento de polimento, como a coagulação/floculação, que poderá ser realizada como processo sequencial a biorremediação.

5. REFERÊNCIAS

- ADULKAR, T.V.; RATHOD, V.K., Ultrasound assisted enzymatic pre-treatment of high fat content dairy wastewater, Ultrasound assisted enzymatic pre-treatment of high fat content dairy wastewater. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p.1083-1089, 2014.
- ALBERTON, D., MITCHELL, D.A., CORDOVA, J., ZAMORA, P.P., KRIEGER, N. Production of a Fermented Solid Containing Lipases of *Rhizopus microsporus* and its Application in the Pre-Hydrolysis of a High-Fat Dairy Wastewater. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, p. 28–35, 2010.
- ALVES, A.M.; MOURA, R.B.; CARVALHO, A.K.F.; CASTRO, H.F.; ANDRADE, G.S.S. *Penicillium citrinum* whole-cells catalyst for the treatment of lipid-rich wastewater. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, p.433-438, 2019.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official **Methods of analysis of AOAC International**. 18. ed. Washington: AOAC, 2005.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 22nd edition. Edited by RICE, E.W.; BAIRD, R.B.; EATON, A.D. AND CLESCERI, L.S. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF), Washington, D.C., USA. 2012.
- ASHFAQ, M. Basmati–Rice a Class Apart (A review). **Rice Research: Open Access**, v. 03, n. 04, p.1-8, 2015.
- BARRIOS- GONZÁLES, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v.47, n. 2, p. 175-185, 2012.
- BINOD, P.; PANDEY, A., SINDHU, R. Solid-State Fermentation for the production of Poly(hydroxyalkanoates). **Chemical and Biochemical Engineering**, v. 9, p. 173–181, 2015.
- CARVALHO, A *et al.* Recent Advances in Lipase-Mediated Preparation of Pharmaceuticals and Their Intermediates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 29682-29716, 2015.
- CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE–CONAMA. Legislação Ambiental Federal, **Resolução n° 430**, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e de outras providências.
- CORTEZ, D.V.; CASTRO, H.F.; ANDRADE, G.S.S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 30, p.1-10, 2016.

DALMAU, E., MONTESINOS, J.L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbiol Technology**, v. 26, p. 657-663, 2000.

DURLI, E. **Tratamento de efluentes de indústria de laticínios utilizando lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11**. 111f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica)-Programa de Pós graduação em Química, UFPR, Curitiba-PR, 2007.

FURINI, G *et al.* Production of lipolytic enzymes by bacteria isolated from biological effluent treatment systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2955-2965, 2018.

GUERRAND, D. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. **Ocl**, v. 24, n. 4, p.403-413, 2017.

JAEGER, K. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23-34, 2018.

KANMANI, P.; ARAVIND, J.; KUMARESAN, K. An insight into microbial lipases and their environmental facet. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 3, p. 1147-1162, 2014.

KAPOOR, M.; GUPTA, M.N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p.555-569, 2012.

KRÜGER, C. Síntese enzimática de éster do biodiesel a partir de lipases fúngicas de *Penicillium sumatrense* produzidas por fermentação no estado sólido. Dissertação (Mestrado em Bioenergia), Universidade Estadual do Oeste do Paraná-UNIOESTE, Toledo/PR, 2018.

LAGE, F.A.P.; BASSI, J.J.; CORRADINI, M.C.C.; TODERO, L.M.; LUIZ, J.H.H.; MENDES, A.A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56-67, 2016.

LEE, L.P.; KARBUL, H.M.; CITARTAN, M.; GOPINATH, S.C.B. Lipase-Secreting Bacillus Species in an Oil-Contaminated Habitat: Promising Strains to Alleviate Oil Pollution. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

LEITE, R.M.V.B.C.; BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C. **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa, 641p, 2005.

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.101410-101420, 2019.

MENDES, A.A & DE CASTRO, H.F. **Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos**. *Química Nova*, v. 28, n. 2, 296-305, 2005.

MAROTTI, B.S.; CORTEZ, D.V.; GONÇALVES, D.; CASTRO, H.F. Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. **Química Nova**, p. 1-10, 2017.

MENONCIN, S.D.; DOMINGUES, N.M.; FREIRE, D.M.G.; TONIAZZO, G. Study of the Extraction, Concentration, and Partial Characterization of Lipases Obtained from *Penicillium verrucosum* using Solid-State Fermentation of Soybean Bran. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 537-544, 2010.

OLIVEIRA, A.C.D.; WATANABE, F.M.; RODRIGUES, M.L.F.; VARGAS, J.V.C.; MARIANO, A.B. Lipase production by endophytic yeast through factorial design. **Academia Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 1, p. 16–21, 2013.

OLIVEIRA, A.C. **Síntese enzimática do biodiesel de microalgas a partir de lipases produzidas por fungos endofíticos**. 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I. **Bioprocesses and products**. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153–1169, 1999.

PINTOR, A.M.A.; VILAR, V. J.P.; BOTELHO, C. M.S.; BOAVENTURA, R. A.R. Oil and grease removal from wastewaters: Sorption treatment as an alternative to state-of-the-art technologies. A critical review. **Chemical Engineering Journal**, v. 297, p. 229-255, 2016.

POHANKA, M. Biosensors and Bioassays Based on Lipases, Principles and Applications, a Review. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 616-630, 2019.

PREMNATH, A.; NARAYANA, M.; RAMAKRISHNAM, C.; KUPPUSAMY, S.; CHOCKALINGAM, V. Mapping quantitative trait loci controlling oil content, oleic acid and linoleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus L.*). **Molecular Breed**, v. 36, n. 7, p. 1-7, 2016.

PRIJI, P.; UNNI, K.N.; SREEDHARAN, S.; BINOD, P.; BENJAMIN, S. Production, optimization, and partial purification of lipase from *Pseudomonas sp.* strain BUP6, a novel

rumen bacterium characterized from Malabari goat. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 71-78, 2014.

RODRIGUES, M.L.F.; DA SILVA, E.A.; BORBA, C.E., OLIVEIRA, A.C.D.; KRUGER, C.; RAIMUNDO, R. W.; SILVA, L.P.; VANZIN, M.; STUANI, B.T. 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.

TEN, L. N.; TAEK, I. W.; KYUM, K. M.; SUK, K. M.; TAIK, L. S. Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 375-382, 2004.

THAKUR, V.; TEWARI, R.; SHARMA, Rohit. Evaluation of Production Parameters for Maximum Lipase Production by *P. stutzeri* MTCC 5618 and Scale-Up in Bioreactor. **Chinese Journal of Biology**, v. 2014, p.1-14, 2014.

VALENTE, A.M.; ALEXANDRE, V.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 483-488, 2010.

World Atlas. **Top Cows' Milk Producing Countries in the World**, 2018.

ZAITSEV, S.Y.; SAVINA, A.A.; ZAITSEV, I.S. Biochemical aspects of lipase immobilization at polysaccharides for biotechnology. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 272, p. 102016-102016, 2019.