

ANÁLISE DA PRODUÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE LIPASES A PARTIR DE DISTINTOS FUNGOS FILAMENTOSOS

Data de submissão: 10/11/2024

Data de aceite: 02/01/2025

Rafaela Lopes da Silveira

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) campus JK, Instituto de Ciência e Tecnologia. Diamantina-MG, Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/6128256740074291>

Biatriz Vitória Araujo dos Santos

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) campus JK, Instituto de Ciência e Tecnologia. Diamantina-MG, Brasil.
<https://lattes.cnpq.br/8066331834961710>
<https://orcid.org/0009-0003-9541-4520>

Vivian Machado Benassi

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) campus JK, Instituto de Ciência e Tecnologia. Diamantina-MG, Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/8244877867115110>
<https://orcid.org/0000-0002-6030-0473>

RESUMO: Observa-se um grande aumento na utilização de enzimas como biocatalizadores em diferentes processos industriais, visto que catalisam seletivamente o substrato fazendo com que o produto seja obtido de maneira mais pura, diminuindo, assim, custos de produção e geração de

compostos indesejados. Pesquisas acerca da produção de lipases possuem poderoso potencial biotecnológico em virtude da gama de reações que catalisam tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico, o que permite sua aplicação em diversos processos como a produção de biodiesel, detergentes, cosméticos, alimentos e outros. O presente trabalho objetivou realizar uma triagem qualitativa e quantitativa de diferentes fungos filamentosos potenciais produtores de lipases. Inicialmente quinze fungos filamentosos isolados de queijo minas artesanal de casca florida foram repicados em meio de cultura sólido próprio para lipases, à 30°C, por 48 horas, sendo selecionadas quatro linhagens identificadas como QCPCB3, QMEACB8, QBPS232 e QBPL233, com raios enzimáticos de 4,65 cm, 3,70 cm, 3,50 cm e 3,50 cm, respectivamente. Esses quatro isolados foram submetidos à determinação da produção quantitativa de lipases em meio submerso Carvalho-Peixoto (CP) contendo óleo de soja como fonte de carbono, à 30°C, por 120 horas, e a maior atividade lipolítica foi observada para o fungo QBPL233 com 3,62 U.mL⁻¹, seguido de QMEACB8 com 3,48 U.mL⁻¹ e QCPCB3 com 3,42 U.mL⁻¹. Com base nesses resultados, pode-

se concluir a importância de realizar uma triagem qualitativa, entretanto, a atividade real enzimática é obtida por quantificação, assim como, não há uma relação direta entre o tamanho do microrganismo com produção enzimática. Dessa forma, salienta-se a importância de otimizar os processos de produção enzimática para aplicação biotecnológica.

PALAVRA-CHAVE: Biotecnologia, Enzimas, Fungos Filamentosos, Lipases.

ANALYSIS OF QUALITATIVE AND QUANTITATIVE PRODUCTION OF LIPASES FROM DIFFERENT FILAMENTOUS FUNGI

ABSTRACT: A significant increase has been observed in the use of enzymes as biocatalysts in various industrial processes, as they selectively catalyze substrates, yielding purer products and thereby reducing production costs and the generation of unwanted compounds. Research on lipase production has powerful biotechnological potential due to the wide range of reactions they catalyze in both aqueous and organic media, enabling their application in various processes such as biodiesel production, detergents, cosmetics, food, and others. This study aimed to perform a qualitative and quantitative screening of different filamentous fungi with potential for lipase production. Initially, fifteen filamentous fungi isolated from artisanal Minas cheese with a bloomy rind were replicated on a solid culture medium suitable for lipase activity at 30°C for 48 hours, and four strains identified as QCPCB3, QMEACB8, QBPS232, and QBPL233 were selected, with enzymatic halos measuring 4.65 cm, 3.70 cm, 3.50 cm, and 3.50 cm, respectively. These four isolates were subjected to quantitative determination of lipase production in submerged Carvalho-Peixoto (CP) medium containing soybean oil as the carbon source at 30°C for 120 hours, with the highest lipolytic activity observed in QBPL233 at 3.62 U.mL⁻¹, followed by QMEACB8 at 3.48 U.mL⁻¹ and QCPCB3 at 3.42 U.mL⁻¹. Based on these results, it can be concluded that qualitative screening is important; however, actual enzymatic activity is obtained through quantification, and there is no direct relationship between the microorganism's size and enzyme production. Therefore, the importance of optimizing enzyme production processes for biotechnological application is highlighted.

KEYWORDS: Biotechnology, Enzymes, Filamentous Fungi, Lipases.

1 | INTRODUÇÃO

Dentre os diversos organismos existentes destacam-se os fungos filamentosos, que estão presentes nos mais diversos ecossistemas da Terra, desde regiões frias a regiões com níveis de radiação mais altos, sendo capazes de se adaptarem a condições ambientais extremas. Dessa forma, esses organismos podem ser cultivados em laboratório em diferentes composições de meios e condições facilmente controláveis (RAWAT, 2015; CHAMBERGO; VALENCIA, 2016).

Além da facilidade de cultivo, os fungos filamentosos contemplam a capacidade natural de degradar e transformar produtos, visto que excretam diversos compostos como ácidos orgânicos, antimicrobianos, enzimas e outros. Nesse sentido, observa-se o grande interesse biotecnológico que esses microrganismos detêm, visto que podem ser utilizados em processos fermentativos para a produção de bebidas e massas, estão envolvidos no

processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, na medicina destacam-se na produção de antibióticos a partir de seus metabólitos e são produtores de enzimas de interesse industrial (ABREU *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017).

Enzimas são catalisadoras de reações dos sistemas biológicos que podem ser produzidas por fungos filamentosos, bactérias, leveduras, plantas e animais, e quando comparadas aos catalisadores químicos demonstram ser extremamente vantajosas, visto que são facilmente degradáveis, reutilizáveis e não possuem toxicidade, dessa maneira, seu uso não provoca danos ao meio ambiente. Ademais, essas biomoléculas catalisam seletivamente o substrato fazendo com que o produto seja obtido de maneira mais pura, diminuindo, assim, custos de produção (SILVEIRA; ROCHA; BENASSI, 2021).

Com o decorrer dos anos, observa-se um grande aumento na utilização de enzimas como biocatalizadores em diferentes processos industriais em virtude das vantagens que seu uso proporciona e devido a atual preocupação com a situação ambiental do planeta, fazendo-se necessário o uso de tecnologias e processos de produção menos agressivos ambientalmente. Dessa maneira, é possível verificar a aplicação de enzimas na indústria farmacêutica, cosméticos, alimentícia, têxtil, tratamento de efluentes, biocombustíveis, papel e celulose e outros. Sendo assim, a pesquisa de novas enzimas e o melhoramento do desempenho de catálise daquelas já conhecidas é de extrema importância no que tange a aplicação dessas biomoléculas em larga escala (RIGOLDI *et al.* 2018; SILVEIRA; ROCHA; BENASSI, 2021).

Dentre as principais enzimas de interesse biotecnológico, destacam-se as lipases ou triacilglicerol acil-hidrolases (EC 3.1.1.3), que podem ser encontradas em animais, vegetais e microrganismos e catalisam tanto reações de hidrólise, transformando acilgliceróis de cadeia longa em diacilgliceróis, monoacilgliceróis e **ácidos graxos livres**, quanto reações de síntese, modificando lipídios por meio de esterificação, transesterificação, aminólise e lactonização. Vale citar que o sentido da reação é definido pela quantidade de água presente no meio reacional, sendo a hidrólise favorecida em meio aquoso e a síntese na presença de solventes (VERMA; MEGHWANSHI; KUMAR, 2021; BORRELLI; TRONO, 2015).

As lipases são biocatalisadoras altamente específicas ao substrato de ação e a forma de hidrólise, e essa característica permite a classificação dessa enzima em: lipases regiosseletivas, específicas em relação à posição de hidrólise do triacilglicerol; lipases tipo-seletivas, as quais são específicas quanto ao tamanho da cadeia carbônica ou ao número de insaturações do triacilglicerol; lipases enantiosseletivas, que são capazes de discriminar enantiômeros em uma mistura racêmica (POHANKA, 2019; SILVEIRA; ROCHA; BENASSI, 2021).

A forma específica de ação das lipases, juntamente com a capacidade de catalisar diversos tipos de reações em solventes orgânicos, são fatores que fomentam seu potencial de aplicação industrial, que é amplamente expresso na indústria de papel e celulose para

o tratamento da madeira; alimentícia para a produção de queijos curados desenvolvendo sabor e aroma específico; no melhoramento das características de massas; na modificação de óleos e gorduras de pouco valor em lipídios com particularidades mais cobiçadas; no setor têxtil para o melhoramento do tecido e remoção de lubrificantes; na indústria de detergentes, afim de potencializar a remoção de manchas de gordura nos utensílios que forem aplicados; para a produção de fármacos e cosméticos; no tratamento de efluentes de diversos setores industriais que emitem altos teores de lipídios e ésteres em seus rejeitos e biocombustíveis para a produção de biodiesel (SALIHU; ALAM, 2015; BILAL et al., 2021).

No decorrer dos anos, lipases de diversos tipos de organismos vêm sendo relatadas, dentre estes os fungos filamentosos, entretanto, apenas um número limitado de lipases microbianas foi totalmente caracterizadas e purificadas para fins industriais, fazendo com que sua aplicação seja relativamente onerosa. Com isso, o estudo de novos organismos, bem como a otimização do processo de produção já existente através da pesquisa de meios de obtenção e da caracterização dessas enzimas é de extrema importância no que diz respeito à exploração do seu potencial biotecnológico (VERMA; MEGHWANSHI; KUMAR, 2021).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo realizar a análise da produção de lipases qualitativa e quantitativa a partir de distintos fungos filamentosos.

2 | METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia, Enzimologia e Desenvolvimento de Produtos (LMEDP), da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) *campus* JK, Diamantina, Minas Gerais, Brasil. Os microrganismos foram cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

2.1 Microrganismos utilizados no desenvolvimento da pesquisa

Foram selecionados quinze fungos filamentosos isolados anteriormente de amostras de queijo minas artesanal de casca florida, sendo eles: QMEAB26, QMEACB8, QMEALC3, QMEALC7, QMEABC8, QCPCCA, QCPCCB, QCPCB3, 2QBD32, 2QBD35, QBPS232, QBPS122, QBPL233, 1Q522B, 2QLD35. Esses fungos filamentosos foram preservados em sílica gel em tubos de ensaio com tampa de rosca e armazenados à 4°C (MICHELIN *et al.*, 2009).

2.2 Reativação das cepas dos fungos filamentosos

Preparou-se meio de cultura sólido próprio para lipases proposto por Marinho

(2011), cuja composição consistiu em: 0,4 g.L⁻¹ de extrato de levedura; 10g.L⁻¹ de azeite de oliva extra virgem; 0,1 g.L⁻¹ de cloreto de sódio; 0,2 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio e 20 g.L⁻¹ de ágar bacteriológico. Os meios foram autoclavados à 1 atm, 120°C, por 20 minutos e vertidos em placas de Petri, previamente esterilizadas, em capela de fluxo laminar próximo ao bico de Bunsen. As sílicas gel contendo os esporos fúngicos foram colocados sobre o meio de cultura e incubados à 30°C em estufa bacteriológica até que os microrganismos crescessem.

2.3 Análise da produção qualitativa de lipases a partir dos fungos filamentosos

A análise foi realizada seguindo a metodologia descrita por Hankin Anagnostakis (1975), que consistiu na utilização do meio de cultivo sólido para a detecção da produção qualitativa de enzimas a partir de fungos.

Dessa forma, os quinze fungos filamentosos foram repicados, pontualmente ao centro da placa de Petri, contendo meio de cultura sólido para lipases (Marinho, 2011) estéril em capela de fluxo laminar previamente higienizada com álcool 70% e atrás da chama do bico de Bunsen, de modo a garantir a esterilidade durante o repique.

Após o repique, os meios foram incubados em estufa bacteriológica à 30°C, durante 48 horas, para o crescimento dos fungos filamentosos. Após o período de incubação, realizou-se a revelação da produção qualitativa das lipases utilizando-se uma solução reveladora composta por NaOH 0,1M e fenolftaleína 2%.

Para isso, inseriu-se 10 mL da solução relevadora às placas de Petri para a observação de halos transparentes ao redor do micélio fúngico, caracterizando a formação dos halos lipolíticos, os quais foram medidos em quintuplicatas com o auxílio de um paquímetro, obtendo a medida em centímetros.

2.4 Análise da produção quantitativa de lipases a partir dos fungos filamentosos previamente selecionados

A partir dos resultados obtidos pela análise da produção qualitativa de lipases, selecionaram-se quatro fungos filamentosos, os quais apresentaram halos enzimáticos superiores a 3,5 cm.

Inicialmente, prepararam-se 50 mL de meios de cultura submersos Carvalho-Peixoto (CP) (PEIXOTO *et al.*, 2003), composto por 0,8 g de extrato de levedura; 0,03 g de KH₂PO₄; 0,05 g de MgSO₄ e 2,5 mL de óleo de soja como fonte de carbono para 100 mL de água destilada, contidos em Erlenmeyer de 250 mL, sendo esses autoclavados à 120°C, durante 20 minutos, à 1,0 atm.

Para a realização do inóculo do fungo no meio, utilizou-se um bastão de aço inox de 1 cm de diâmetro, previamente esterilizado em autoclave, sendo retirados três discos de cada isolado fúngico das placas de Petri, os quais foram adicionados nos frascos

Erlenmeyer contendo 50 mL do meio de cultivo estéril. Todo o procedimento foi realizado em triplica para cada fungo, sendo os meios mantidos de forma estacionária em estufa bacteriológica, à 30°C, durante 120 horas de cultivo.

Decorrido o tempo de incubação, a massa micelial foi obtida através da filtração à vácuo com o auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro Unifil®, 12,5 cm de diâmetro. Após a filtração, obteve-se o extrato bruto extracelular contendo as enzimas de interesse, sendo essas submetidas à medição do pH em pHmetro, medição de volume (em mL) em proveta volumétrica e dosagem enzimática para a determinação da atividade lipolítica.

2.5 Determinação da quantidade de proteína do extrato bruto extracelular

A dosagem de proteínas foi realizada com base na metodologia proposta por Bradford (1976), utilizou-se a albumina de soro bovino (BSA) como padrão a uma concentração de 100 µg.mL⁻¹, variando de 0 a 100 µg.mL⁻¹.

Para a realização da dosagem de proteínas, adicionou-se 500 µL do reagente de Bradford e 50 µL de extrato bruto enzimático ou 50 µL de água destilada para o branco em tubos de ensaio, deixando no escuro durante 5 minutos para reagir. Decorrido o tempo de incubação, realizou-se a leitura em microplacas em espectrofotômetro tipo Elisa Locus LMR-96, à 595 nm.

Visto que o procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra, utilizou-se a média das absorbâncias para o cálculo da quantidade de proteína, que foi feito a partir da Equação 1.

$$A_p = \frac{Abs}{fator} \times \frac{1}{V_{extrato}} \quad (1)$$

Sendo:

A_p – atividade de proteína (mg.mL⁻¹);

Abs – média das absorbâncias de cada amostra;

Fator – inclinação da reta da curva padrão do reagente de Bradford;

$V_{extrato}$ – volume de extrato bruto enzimático utilizado na reação em mL.

2.6 Determinação da atividade lipolítica do extrato bruto extracelular

A dosagem enzimática foi baseada na hidrólise do substrato sintético *p*-nitrofenil-palmitato. Inicialmente, prepararam-se duas soluções, denominadas de solução I e solução II, compostas por:

Solução I:

50 µL de Triton X-100;

0,01 g de goma arábica;

18 mL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 6,0.

Solução II:

0,07 g de *p*-nitrofenil-palmitato;

10 mL de isopropanol.

Ambas as soluções foram homogeneizadas em agitador magnética e misturadas em uma proporção 1:1 formando a solução III, no ato da dosagem da atividade. Adicionou-se 450 μ L da solução III à 50 μ L de extrato bruto enzimático em tubos de ensaio, deixando reagir durante 10 minutos em banho-maria à 50°C. Decorrido o tempo de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 500 μ L de uma solução saturada de tetraborato de sódio.

Para o preparo do branco, adicionou-se 50 μ L de extrato bruto enzimático em tubos de ensaio, deixando em água fervente por 5 minutos de modo a desnaturar a enzima e após o tempo de fervura, adicionou-se 450 μ L da solução III e 500 μ L da solução saturada de tetraborato de sódio.

Por fim, adicionou-se 200 μ L dos produtos de reação e do branco em cada poço da microplaca para a leitura em espectrofotômetro à 405 nm. Visto que o procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra, utilizou-se a média das absorbâncias para o cálculo da atividade enzimática, que foi feito através da Equação 2.

$$A_l = \frac{Abs}{fator} \times \frac{1}{t_{reação}} \times \frac{1}{V_{extrato}} \quad (2)$$

Sendo:

A_l – Atividade lipolítica (U.mL⁻¹);

Abs – média das absorbâncias de cada amostra;

Fator – inclinação da curva padrão do *p*-nitrofenol;

$t_{reação}$ – tempo de reação em minutos;

$V_{extrato}$ – volume de extrato bruto enzimático utilizado na reação em mL.

2.7 Reprodutibilidade

Os experimentos foram realizados em triplicata, onde as médias e desvios-padrão foram calculados utilizando o software MS Excel.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise qualitativa da produção de lipases pelos quinze fungos filamentosos selecionados foi possível observar que os microrganismos que apresentaram maior produção de lipases foram aqueles que desenvolveram maior halo enzimático, sendo os isolados QMEACB8 com 3,7 cm, QCPCB3 com 4,65 cm, QBPS232 com 3,5 cm e

QBPL233 com 3,5 cm (Tabela 1). Os halos enzimáticos foram identificados pela formação de uma zona clara ao redor da colônia fúngica resultante da acidificação do meio pela liberação de ácidos graxos, contra a coloração rosa no restante do meio, obtido através da solução reveladora.

A análise qualitativa da produção de lipases em meio de cultura sólido é de extrema importância para o estudo inicial de microrganismos produtores de enzimas devido a sua facilidade de execução e por não exigir muitos reagentes e aparelhos, tornando o procedimento pouco oneroso.

A análise qualitativa da produção de lipases em meio de cultura sólido pode ser observada em demais trabalhos na literatura. Os resultados obtidos com o presente estudo podem ser comparados com os resultados observados por Rocha *et al.* (2021), onde foi analisado a produção qualitativa de lipases de nove fungos filamentosos oriundos da casca e do óleo de macaúba, onde foi possível verificar que os melhores produtores qualitativos de lipases foram os isolados identificados como ARO1, ARO2 e ARC3, os quais apresentaram raios enzimáticos de 0,43 cm, 0,30 cm e 0,27 cm, respectivamente, sendo estes inferiores aos halos enzimáticos obtidos no presente trabalho.

Fungos	Raio Micelial (cm)	Raio enzimático (cm)
1Q522B	0,10	0,50
2QBD32	0,70	1,00
2QBD35	1,00	1,50
QBPL233	2,50	3,50
QBPS122	0,50	1,00
QBPS232	3,00	3,50
QCPCB3	0,97	4,65
QCPCCA	2,00	2,23
QCPCCB	1,59	2,33
QMEAB26	1,50	2,93
QMEABC8	1,70	2,68
QMEACB8	0,58	3,70
QMEALC3	1,88	2,68
QMEALC7	1,50	2,63
2QLD35	0,80	1,50

Tabela 1 – Raios miceliais e halos enzimáticos em centímetros dos quinze fungos filamentosos analisados.

Fonte: Próprio autor.

Spencer *et al.* (2020) também avaliou a produção qualitativa de lipases de fungos filamentosos em meio de cultura sólido próprio para lipases, sendo estudados vinte fungos filamentosos isolados de diversas fontes e os melhores produtores qualitativos foram

isolados de folha de jabuticaba (identificados como PJ12 e PJ4), bagaço de cana-de-açúcar (identificado como 3.2TA) e casca de árvore (identificado como M1.7.1), onde os halos enzimáticos foram de 0,39 cm, 0,24 cm, 0,92 cm e 0,31 cm, para as cepas PJ12, PJ4, 3.2TA e M1.7.1, respectivamente. Assim, os halos enzimáticos obtidos foram inferiores aos observados em nosso estudo.

Já Costa *et al.* (2020) analisou a produção qualitativa de lipases de vinte e um fungos filamentosos isolados de diversas fontes, onde os melhores produtores foram isolados de solo (A4) e casca de árvore (M1.1), apresentando halos enzimáticos de 0,5 cm e 0,3 cm, respectivamente, sendo estes resultados também inferiores aos observados no presente trabalho.

Por sua vez, foram selecionados os quatro fungos filamentosos que obtiveram halo enzimático igual e superior a 3,5 cm, sendo os identificados como QCPCB3, QMEACB8, QBPS232 e QBPL233, os mesmos foram cultivados em meio submerso contendo óleo de soja como fonte de carbono.

Ao analisar a produção quantitativa, pode-se visualizar que o fungo com maior atividade foi o isolado identificado por QBPL233 com atividade lipolítica de 3,615 U.mL⁻¹, seguido do QMEACB8 com 3,481 U.mL⁻¹ e QCPCB3 com 3,420 U.mL⁻¹.

Fungos	Proteína (mg.mL ⁻¹)	Atividade lipolítica (U.mL ⁻¹)
QBPL233	0,348	3,615
QBPS232	0,122	2,937
QCPCB3	0,073	3,420
QMEACB8	0,104	3,481

Tabela 2 – Determinação da atividade de lipases e da quantidade de proteínas a partir de fungos filamentosos cultivados à 30°C em meio de cultura submerso contendo óleo de soja como fonte de carbono.

Fonte: Próprio autor.

O presente trabalho promoveu resultados superiores aos observados no estudo de Facchini *et al.* (2016), onde vinte e um fungos foram submetidos ao cultivo em meio de cultivo submerso SR (RIZZATTI *et al.*, 2001) contendo glicose e azeite como fontes de carbono, e as lipases foram quantificadas a partir da hidrólise do *p*NPP. Constatando que os melhores produtores foram as cepas *Aspergillus phoenicis*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium verticillioides*, com atividades lipolíticas de 0,724 U.mL⁻¹, 0,410 U.mL⁻¹, 0,450 U.mL⁻¹ e 1,800 U.mL⁻¹, respectivamente.

A partir das análises realizadas, pode-se constatar que os fungos em nosso estudo possuíram potencial de produção de lipases, sendo de suma importância a otimização do cultivo desses isolados visando aumento da produção lipolítica e futura aplicação biotecnológica.

4 | CONCLUSÃO

Uma vez que o interesse por lipases torna-se crescente dentro da indústria devido ao grande potencial de aplicabilidade, é de extrema importância a busca por boas fontes produtoras dessa enzima. Por meio da triagem qualitativa foi possível determinar que as linhagens provenientes de amostras de queijo maturado artesanal com maior potencial de produção de lipases foram os isolados identificados por QMEACB8, QCPCB3, QBPS232 e QBPL233. Esses microrganismos foram cultivados em meio submerso e verificou-se que a maior atividade enzimática foi obtida pelo isolado QBPL233. Nesse sentido, o fungo em questão demonstrou ser um promissor produtor de lipases em um meio de cultivo pouco oneroso, revelando o potencial de aplicação dos microrganismos e das lipases em processos biotecnológicos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, ao Instituto de Ciência e Tecnologia, aos Programas de Pós-Graduação em Biocombustíveis e Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo suporte ao desenvolvimento do trabalho. Aos órgãos de fomento FAPEMIG, CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista UNINGÁ Review**, Maringá, v. 21, n. 1, p. 55-59, mar. 2015.

BILAL, M.; FERNANDES, C. D.; MEHMOOD, T.; NADEEM, F.; TABASSAM, Q.; FERREIRA, L. F. R. Immobilized lipases-based nano-biocatalytic systems — A versatile platform with incredible biotechnological potential. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 175, p. 108-122, abr. 2021.

BORRELLI, G.; TRONO, D. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20774-20840, 1 set. 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248-254, jan. 1976.

CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567-2577, 25 jan. 2016.

COSTA, T. P.; SPENCER, P. V. D.; SOUZA, M. J.; ROCHA, A. C. P.; NELSON, D. L.; PINTO, N. A. V. D.; BENASSI, V. M. Standardization of the cultivation of the isolated filamentous fungus a4 for lipase production. **Brazilian Journal Of Development**, v. 6, n. 10, p. 76404-76423, 2020.

FACCHINI, F.F.A; VICI, A.C; PEREIRA, M.G; M.F, OLIVEIRA; BATISTA, A.C.F; VIEIRA, A.T; SILVA, T.A; JORGE, J.A; POLIZELI, M.L.T.M. A useful methodology to select lipase-catalyzed transesterification aiming biodiesel application. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 10, n. 1, p. 01-13, 2016.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, maio 1975.

MARINHO, B.M. **Produção de lipase por novas linhagens de fungos filamentosos**. [Trabalho de conclusão de curso]. Diamantina. Curso de farmácia. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2011.

MICHELIN, M. (2009) **Potencial dos fungos *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* no desenvolvimento de bioprocessos e propriedades das enzimas xilanolíticas** 236 f. Tese (Doutorado em Ciências—Biologia Comparada) — Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

PEIXOTO, S.C.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **International Microbiology**, v.6, n.4, p.269-273, 2003.

POHANKA, M. Biosensors and Bioassays Based on Lipases, Principles and Applications, a Review. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 616, 10 fev. 2019.

RAWAT, S. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 5, n. 4, p. 47-56, 2015.

RIGOLDI, F.; DONINI, S.; REDAELLI, A.; PARISINI, E.; GAUTIERI, A. Review: engineering of thermostable enzymes for industrial applications. **Api Bioengineering**, v. 2, n. 1, p. 011501, mar. 2018.

RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F.; RECHIA, C.G.V.; POLIZELI M.L.T.M. (2001) Purification and properties of a thermostable extracellular beta-D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **J Ind Microbiol Biotechnol** v. 26, n. 3, p. 156- 160, 2001.

ROCHA, A.C.P.; COSTA, T.P.; SCHMIELE, M.; SANTOS, S.L.B.; ROA, J.P.B.; NELSON, D.L.; BENASSI, V.M. Isolation of potential lipolytic filamentous fungi from Macauba samples for applications in biotechnological processes. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 49426-49442, mai. 2021.

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

SILVEIRA, R. L.; ROCHA, A. C. P.; BENASSI, V. M. Lipases: revisão e aplicação industrial. **Microbiologia: Avanços através dos séculos e constante atualizações tecnológicas**, p. 36-49, 23 nov. 2021. Atena Editora.

SILVEIRA, R. L.; ROCHA, A. C. P.; BENASSI, V. M. Importância biotecnológica das lipases. **Anais do I Congresso de Engenharia de Biotecnologia**, v. 2, n. 3, p. 6, 3 jul. 2021. Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente.

SPENCER, P. V. D.; COSTA, T. P.; SOUZA, M. J.; PINTO, N. A. V. D.; NELSON, D. L.; BENASSI, V. M. Analysis of the Lipolytic Potential of Filamentous Fungi Isolated from Some Plants and Soil Samples in Minas Gerais, Brazil. **Advances In Bioscience And Biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 475-487, 2020.

VERMA, S.; MEGHWANSHI, G. K.; KUMAR, R. Current perspectives for microbial lipases from extremophiles and metagenomics. **Biochimie**, v. 182, p. 23-36, mar. 2021.

WANG, S.; CHEN, H.; TANG, X.; ZHANG, H.; CHEN, W.; CHEN, Y. Q. Molecular tools for gene manipulation in filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 22, p. 8063-8075, 30 set. 2017.