

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA

Marianne Mascarenhas Diniz



PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO SIMULTÂNEAS DE LIPASE DE
YARROWIA LIPOLYTICA UTILIZANDO RESÍDUO DE SEMENTE
DE ROMÃ

RIO DE JANEIRO

2023

Marianne Mascarenhas Diniz

Produção e imobilização simultâneas de Lipase de *Yarrowia lipolytica* utilizando Resíduo de Semente de Romã

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Alimentos.

Orientador(es): Priscilla Filomena Fonseca Amaral
Adejanildo da Silva Pereira

Rio de Janeiro

2023

Marianne Mascarenhas Diniz

PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO SIMULTÂNEAS DE LIPASE DE *YARROWIA*
LIPOLYTICA UTILIZANDO RESÍDUO DE SEMENTE DE ROMÃ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola de Química da Universidade Federal do
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Engenheiro de
Alimentos.

Aprovado em 22 de 12 de 2023.

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D. Sc., UFRJ.

Adejanildo da Silva Pereira, D. Sc., UFRJ.

Rodrigo Pires do Nascimento, D.Sc., UFRJ.

Tamires Carvalho dos Santos, D.Sc., UERJ.

Suely Pereira Freitas, D.Sc., UFRJ

Rio de Janeiro
2023

Em memória de Silvia e Lourdes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar meus passos, por me conceder força nos momentos de dificuldade e por reger, guardar e iluminar meu caminho.

Às minhas avós que sempre torceram por mim, mas não conseguiram ver sua neta se formar.

Aos meus pais, que sempre ajudaram na minha caminhada até o final da faculdade. Quero agradecer a minha mãe, Márcia Mascarenhas, que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis e que comemorou comigo cada vitória. Ao meu pai, Celso Diniz, por ser meu incentivador nesta etapa. Também agradeço aos demais membros da família que sempre torceram por mim.

Aos meus irmãos Bernardo, Isabella e Junior, pois suas presenças me trouxeram alegria e me apoiaram na minha jornada. À minha cunhada, Marihellen, que esteve comigo nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado, que sempre esteve ao meu lado e me ajudou durante toda a faculdade, tornando todos os dias melhores, mais descontraídos e mais alegres. Te amo.

À Priscilla, minha orientadora e professora, que sempre foi maravilhosa comigo em todos esses anos. Que investiu seu tempo e conhecimento em mim, tornando essa jornada mais enriquecedora e inspiradora

Ao Deja ou Nildo ou Adejanildo, que me ensinou tudo que sei dentro do laboratório, que além de coorientador sempre foi meu amigo me apoiando (e me perturbando) em todos os momentos da faculdade e sendo meu parceiro de bandejão.

À Jully, pela amizade e companheirismo ao longo desses anos.

Ao Marcos e Nanci que sempre estiveram do meu lado no laboratório seja para me dar um docinho ou me ajudar.

À todos os professores da UFRJ que participaram da minha formação.

Aos meus amigos dentro e fora da UFRJ que me apoiaram durante esses anos.

Por último, agradeço aos membros da banca examinadora pela disponibilidade de avaliar este projeto final.

Obrigada.

“A distância é curta quando se tem um bom motivo.”

Orgulho e Preconceito, Jane Austen

RESUMO

MASCARENHAS DINIZ, Marianne. Produção e imobilização simultâneas de Lipase utilizando Resíduo de Semente de Romã. Rio de Janeiro, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

O Resíduo da Semente de Romã (RSR) foi utilizado em uma nova estratégia para a produção simultânea de lipase *Yarrowia lipolytica* por fermentação submersa e sua imobilização por adsorção física. Este biocatalisador - o resíduo sólido fermentado contendo a lipase adsorvida (fermRSR) - foi avaliado em reações de hidrólise e na síntese de lipídios estruturados. Em frascos agitados, extrato de levedura e ureia foram as melhores fontes de nitrogênio para produção de lipase com RSR e seu uso simultâneo aumentou ainda mais a produção de lipase. Esse resultado foi confirmado em biorreator de 3,5 litros, com atividade de lipase em meio extracelular de 40 U/mL. Uma taxa de reação máxima (V_{max}) de 49,5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$, uma constante de Michaelis-Menten (K_m) de 207 $\mu\text{mol}/\text{L}$ e um número de renovação (K_{cat}) de 130 s^{-1} foram determinados para o novo biocatalisador, fermRSR, para a hidrólise de *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL) em *p*-nitrofenol. A conversão de *p*-NPL em *p*-nitrofenol em reações subsequentes confirmou o potencial do fermRSR para reações hidrolíticas industriais. A produção de lipídeos estruturados a partir de óleo vegetal e ácidos graxos livres pelo fermRSR evidencia a versatilidade deste novo biocatalisador.

Palavras-chave: Produção de lipase. Imobilização natural. Resíduos agroindustriais. Biocatalisador.

ABSTRACT

MASCARENHAS DINIZ, Marianne. **Produção e imobilização simultâneas de Lipase utilizando Resíduo de Semente de Romã**. Rio de Janeiro, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Pomegranate-seed residue (PSR) was used in a new strategy for the simultaneous production of *Yarrowia lipolytica* lipase by submerged fermentation and its immobilization by adsorption. This biocatalyst - the fermented solid residue containing the adsorbed lipase (fermPSR) - was evaluated in hydrolysis reactions and in structured lipid synthesis. In shake flasks, yeast extract and urea were the best nitrogen sources for lipase production with PSR and their simultaneous use increased the lipase production even further. This result was confirmed in a 3.5-liter bioreactor, with lipase activity in an extracellular medium of 40 U/mL. A maximum reaction rate (V_{max}) of 49.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$, a Michaelis–Menten constant (K_m) of 207 $\mu\text{mol}/\text{L}$, and a turnover number (K_{cat}) of 130 s^{-1} were determined for the new biocatalyst, fermPSR, for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl laurate (*p*-NPL) into *p*-nitrophenol. The conversion of *p*-NPL into *p*-nitrophenol in subsequent reactions confirmed fermPSR's potential for industrial hydrolytic reactions. The production of structured lipids from vegetable oil and free fatty acids by fermPSR evidences the versatility of this new biocatalyst.

Keywords: Lipase production. Natural immobilization. Agroindustrial residues. Biocatalyst.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema reacional da hidrólise e síntese de uma molécula de triacilglicerol catalisada por lipases.....	17
Figura 2 – Morfologia de <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 em meio YPD (extrato de levedura, peptona e glicose): Forma em pseudohifas (a) e leveduriforme (b).	19
Figura 3 – Estrutura da romã	22
Figura 4 – Técnicas de imobilização enzimática.....	24
Figura 5 – RSR após extração do óleo (a) e triturado para utilização em fermentações (b).	31
Figura 6 – Perfil cinético da atividade da lipase extracelular durante cultivo submerso de <i>Yarrowia lipolytica</i> em frascos Erlenmeyer com resíduo de semente de romã (RSR) com e sem suplementação de fontes de nitrogênio.....	32
Figura 7 - Perfil cinético da atividade da lipase extracelular durante cultivo submerso de <i>Yarrowia lipolytica</i> em frascos Erlenmeyer com resíduo de semente de romã (RSR) utilizando melhores fontes de nitrogênio (ureia e extrato de levedura) e suas combinações.	33
Figura 8 – Superfície de resposta do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para produção de lipase extracelular por <i>Y. lipolytica</i> cultivada em frasco Erlenmeyer por 16 h com RSR suplementado com extrato de levedura e ureia.	36
Figura 9 – Perfil cinético da atividade da lipase extracelular durante cultivo submerso de <i>Yarrowia lipolytica</i> em biorreator de 3,5 litros com RSR com extrato de levedura (3 g/L) e ureia (0,1 g/L)	37
Figura 10 - Reutilização de fermRSR em reação de hidrólise com laurato de p-nitrofenila. A atividade enzimática do primeiro ciclo foi ajustada para 100%.....	40
Figura 11 - Teste de dessorção do fermRSR em tampão fosfato a 37 °C com agitação magnética de 500 rpm.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das aplicações industriais das lipases	17
Tabela 2 - Estudos de romã relacionados à saúde em humanos	21
Tabela 3 - Níveis e variáveis analisadas no Delineamento Composto Central Rotacional para avaliação das concentrações ideais das melhores fontes de nitrogênio para produção de lipase.	26
Tabela 4 - Composição centesimal do resíduo de semente de romã (RSR).....	31
Tabela 5- Matriz de execuções experimentais para o Delineamento Composto Central rotacional para produção de lipase por <i>Yarrowia lipolytica</i> cultivada em frascos Erlenmeyer por 16 h em resíduo de semente de romã (RSR) suplementado com extrato de levedura e ureia.....	34
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para o delineamento composto central rotacional para produção de lipase extracelular por <i>Y. lipolytica</i> cultivada em frasco Erlenmeyer por 16 h com resíduo de semente de romã (RSR) suplementado com extrato de levedura e ureia.....	35
Tabela 7 - Parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a lipase imobilizada (fermRSR liofilizada).....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	Generally Regarded As Safe
RSR	Resíduo da Semente de Romã
<i>p</i> -NPL	<i>p</i> -nitrofenil laurato
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
C	Ponto Central
fermRSR	Resíduo De Semente De Romã Fermentado
V_{\max}	Taxa máxima de reação
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_{cat}	Número de rotatividade
ΔG_{E-S}	Energia livre de ligação do substrato
ΔG_{E-T}	Energia livre de ligação do estado de transição
T	Temperatura experimental
R	Constante universal dos gases
TAG	Triacilglicerol
LE	Lipídios Estruturados
CG	Cromatografia Gasosa
FID	Detector de ionização de chama
FAMEs	Ésteres metílicos de ácidos graxos
ANOVA	Análise de Variância Univariada
Teste F	Teste estatístico de Fisher
GL	Graus de liberdade
SQ	Soma de quadrados
QM	Quadrado Médio
L	Termo Linear
R^2	Coefficiente de determinação
F	Teste para comparação da variância do modelo com a variância residual (erro)
AL	Atividade Lipásica
E_t	Concentração de proteína

LISTA DE SÍMBOLOS

R	Constante dos gases ideais ($\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)
p/v	Peso/volume
mL	Mililitro
g/L	Gramas/Litro
rpm	Rotação por minuto
Q	Vazão ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)
g	Aceleração centrífuga
M	Concentração Molar
E_t	Concentração de proteína ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)
min	Minuto
s	Segundo
h	Hora
mg	miligrama
$^{\circ}\text{C}$	Temperatura – Graus Celsius
nm	Nanômetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 LIPASE.....	17
3.2 <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i>	18
3.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE LIPASE.....	19
3.4 IMOBILIZAÇÃO NATURAL DE LIPASE.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 MATERIAIS	25
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO RSR.....	25
4.3 PRODUÇÃO DE LIPASE	25
4.3.1 Preparação de cepa e pré-inóculo	25
4.3.2 Produção de Lipase em Frascos <i>Erlenmeyer</i>	25
4.3.3 Produção de Lipase em Biorreator	26
4.4 CARACTERIZAÇÃO DE RESÍDUO DE SEMENTE DE ROMÃ FERMENTADO LIOFILIZADO (fermRSR)	27
4.4.1 Caracterização físico-química de fermRSR liofilizado	27
4.4.2 Parâmetros cinéticos do fermRSR liofilizado	27
4.4.3 Reações de hidrólise e síntese utilizando fermRSR liofilizado como biocatalisador	28
4.5 REUTILIZAÇÃO DE fermRSR LIOFILIZADO EM REAÇÕES DE BIOCATÁLISE... 28	
4.6 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS.....	29
4.6.1 Concentração celular	29
4.6.2 Atividade Lipolítica	29
4.6.3 Determinação da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa (CG) ... 29	
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO RESÍDUO DE SEMENTE DE ROMÃ (RSR)	31
5.2 PRODUÇÃO DE LIPASE COM RESÍDUO DE SEMENTE DE ROMÃ.....	32

5.3 RESÍDUO DE SEMENTES DE ROMÃ FERMENTADO (fermRSR) COMO BIOCATALISADOR	37
5.4 REAÇÕES DE HIDRÓLISE E SÍNTESE COM fermRSR LIOFILIZADO.....	39
5.5 REUTILIZAÇÃO DE fermRSR LIOFILIZADO EM HIDRÓLISE	40
6 CONCLUSÕES.....	42
7 PUBLICAÇÕES RESULTANTES DO PRESENTE TRABALHO.....	43
8 REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A romã (*Punica granatum L.*) é uma espécie de planta frutífera cultivada em diversas regiões do mundo, incluindo a África tropical, América do Sul e Europa. Durante o seu processamento, são produzidos cerca de 60% dos resíduos, incluindo as sementes (10%) (Aviram et al., 2000). Essas sementes contêm 12 a 20% de óleo (Lansky & Newman, 2007; Elfalleh et al., 2011; Fernandes et al., 2015), com um perfil único de ácidos graxos, especialmente o ácido punícico, que representa 70 a 76% dos ácidos graxos totais. Os ácidos graxos insaturados, como os ácidos oleico e linoleico, também contribuem para esse perfil (Viladomiu et al., 2013).

Considerando a importância da composição rica em ácidos graxos do óleo de romã para a saúde humana, muitos estudos se concentraram em sua extração (Goula, 2013; Durdevic et al., 2017). No entanto, alguns desses compostos ainda permanecem no sólido residual, que pode ser usado como matéria-prima para o crescimento microbiano e para a obtenção de produtos de alto valor (Laufenberg et al., 2003).

Embora os resíduos agroindustriais sejam ricos em nutrientes, como mencionado, muitos desses apresentam deficiências de alguns elementos, na maioria das vezes cruciais para o crescimento dos microrganismos, como é o caso do nitrogênio. Desse modo, de forma a estar explorando o máximo potencial dos resíduos agroindustriais, como matérias-primas alternativas para o cultivo de microrganismos, vários estudos têm reportado a utilização de fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio em conjunto com estes para aumentar a produtividade dos produtos de interesse (Nunes et al., 2021). Dentre esses produtos, as lipases têm recebido grande atenção (Pereira et al., 2019).

As lipases podem catalisar a hidrólise de triglicerídeos e, em baixas quantidades de água, também podem catalisar a síntese de vários ésteres (Treichel et al., 2010; Gupta et al., 2004). Essas enzimas podem ser produzidas em processos fermentativos por diversos microrganismos, como a levedura *Yarrowia lipolytica*. Esta espécie não é patogênica e, portanto, produtos GRAS (*Generally Recognized as Safe*) podem ser obtidos a partir de seu metabolismo (Liu et al., 2015).

As lipases podem ser utilizadas na forma livre ou imobilizada. Esta última forma é preferível devido a várias vantagens, como maior estabilidade da enzima e potencial de reutilização, o que reduz o custo do processo enzimático (Pereira et al., 2019; Aguieiras et al., 2014). Uma abordagem interessante para a imobilização é a adsorção espontânea de enzimas em resíduos sólidos durante o processo de fermentação, que tem sido relatada nos últimos anos

com resultados promissores (Pereira et al., 2019; Aguiéiras et al., 2014; Todeschini et al., 2016; Aguiéiras et al., 2019). Os resíduos sólidos do meio de cultura também funcionam como suportes que mantêm a enzima adsorvida (Aguiéiras et al., 2014). Assim, durante a fermentação de resíduos agroindustriais por fermentação submersa, dois produtos com valor agregado são obtidos com esta nova estratégia, o extrato enzimático bruto (enzima livre) e o sólido fermentado contendo a enzima adsorvida (enzima imobilizada), que muitas vezes é descartado após a fermentação.

Dessa forma, a produção e a imobilização de lipase de *Yarrowia lipolytica* utilizando resíduo agroindustrial destaca-se como uma estratégia abrangente e sustentável, reforçando não apenas a produção eficiente de enzimas, mas também a integração responsável e ecológica desses processos inovadores na indústria de biotecnologia.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Explorar uma nova estratégia para a produção (fermentação submersa) e imobilização natural (adsorção física) simultâneas de lipase de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682/1, utilizando resíduo de semente de romã e avaliar o potencial de uso do resíduo sólido fermentado contendo a lipase adsorvida como um biocatalisador em reações de hidrólise e síntese de lipídios estruturados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

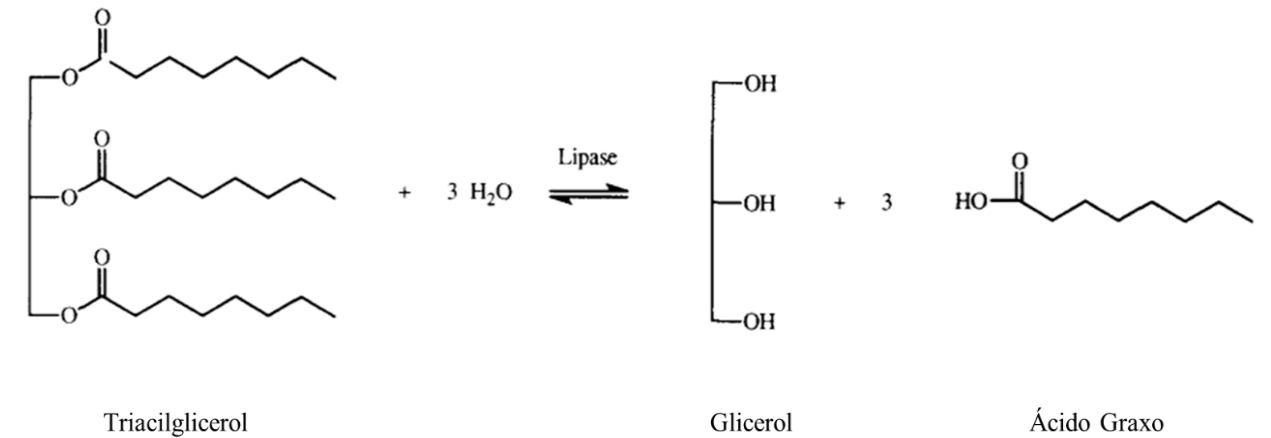
- Produzir lipase por *Yarrowia lipolytica* em meio de cultivo contendo os resíduos de semente de romã (RSR);
- Avaliar o efeito do RSR suplementado com diferentes fontes de nitrogênio na produção de lipase;
- Otimizar a produção de lipase em fermentação submersa utilizando o RSR suplementado com fonte de nitrogênio através de planejamento experimental;
- Avaliar a produção de lipase nas condições otimizadas em biorreator de 3,5 L;
- Testar o potencial do sólido fermentado obtido na fermentação submersa como biocatalisador;
- Avaliar a reutilização do novo biocatalisador;
- Realizar a caracterização físico-química do novo biocatalisador para direcionar suas aplicações;
- Avaliar o potencial do sólido fermentado, contendo lipase adsorvida, para reações de hidrólise e síntese de lipídios estruturados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LIPASE

As lipases, também conhecidas como triacilglicerol hidrolases (EC 3.1.1.3), constituem um grupo de enzimas amplamente reconhecidas por sua versatilidade, importância em diversas áreas da indústria e fácil produção em massa (Hasan et al., 2016). Estas enzimas desempenham um papel essencial na catálise da hidrólise de óleos e gorduras (Figura 1) e, em baixas quantidades de água, atuam como catalisadores em várias reações de síntese tais como a esterificação, a transesterificação e a interesterificação (Jaeger e Reetz, 1998; Reis et al., 2009).

Figura 1 – Esquema reacional da hidrólise e síntese de uma molécula de triacilglicerol catalisada por lipases



Fonte: Jaeger et al. (1994).

A capacidade multifuncional da lipase as torna uma escolha valiosa na indústria alimentícia, de detergentes, farmacêutica e em muitos outros setores (Sharma et al., 2001; Ali et al., 2023) Na Tabela 1 é apresentado um resumo com as principais aplicações industriais das lipases.

Tabela 1 – Resumo das aplicações industriais das lipases

Setor industrial	Aplicação
Detergente	As lipases são utilizadas nas formulações de detergentes para lavanderia, garantindo a remoção da gordura

Oleoquímico	As lipases são utilizadas para catalisar reações de hidrólise e glicólise utilizando substratos mistos, garantindo a economia de energia, alta produtividade e operação contínua do processo
Médico e Farmacêutico	As lipases são utilizadas para reduzir o nível de colesterol no sangue, dentre outras funções
Tratamento de efluente	As lipases são utilizadas em lodos ativados garantindo que as camadas de gorduras sejam removidas
Papel e celulose	As lipases são utilizadas para catalisar a hidrólise dos triglicerídeos presentes na madeira para posterior produção de papel e celulose
Alimentício	As lipases são utilizadas na clarificação de gordura, maturação dos queijos, lipólise de queijos, desenvolvimento de sabores e processamento de carnes, vegetais, frutas, cervejas e outros

Adaptado de Choudhury e Bhunia (2015).

As lipases podem ser obtidas de diversas fontes como vegetal, animal e microbiana. As microbianas têm ganhado destaque devido a sua estabilidade, facilidade de purificação, modificação molecular atividade e capacidade de comparação contínua (Ali et al., 2023). Diferentes microrganismos podem ser utilizados para a produção de lipase, destacando-se as bactérias e os fungos (Treichel et al., 2010). Dentre os fungos, a levedura *Yarrowia lipolytica* tem chamado bastante atenção.

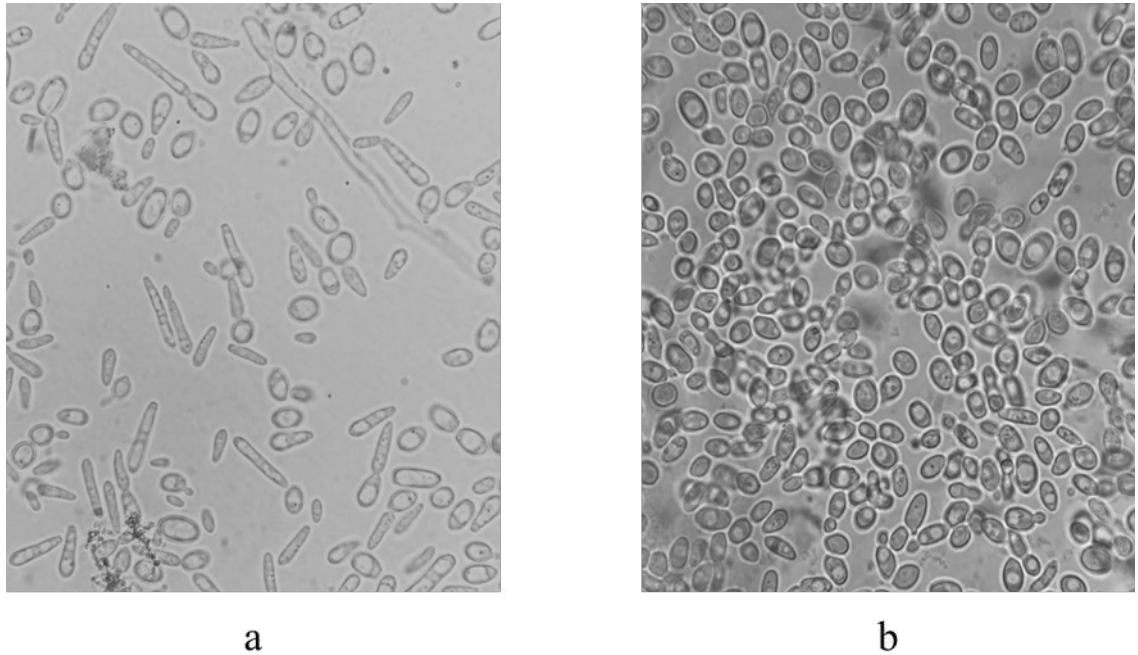
3.2 YARROWIA LIPOLYTICA

Yarrowia lipolytica é uma levedura “não-convencional”, termo utilizado para diferenciar este grupo das leveduras mais comumente usadas, pertencente à classe dos *Ascomycetos* e subclasse *Hemiascomycetos*. Inicialmente foi identificada como *Candida lipolytica* pois a espécie foi isolada de materiais ricos em lipídios, porém posteriormente foi renomeada para *Endomycopsis lipolytica*, depois para *Saccharomyces lipolytica* e atualmente é denominada por *Yarrowia lipolytica* (Heard & Fleet, 1999).

Y. lipolytica é considerada não patogênica pela *American Food and Drug Administration* (FDA) e possui status GRAS (*Generally Regarded As Safe*) (Tsugawa et al., 1969), permitindo assim que os produtos sintetizados pela mesma possam ser utilizados na

indústria de alimentos, bebidas e farmacêutica. É uma levedura que apresenta característica dimórfica, e por isso pode apresentar formação leveduriforme ou de pseudohifas (Figura 2).

Figura 2 – Morfologia de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio YPD (extrato de levedura, peptona e glicose): Forma em pseudohifas (a) e leveduriforme (b).



Fonte: Elaboração própria.

Y. lipolytica destaca-se pela capacidade de assimilar e fermentar diversas fontes de carbono, abrangendo tanto materiais hidrofílicos (como glicose, glicerol, álcoois e acetato) quanto substratos hidrofóbicos (como ácidos graxos, triacilgliceróis e alcanos), culminando na produção de metabólitos como 2-fenil etanol, ácidos orgânicos e lipídios que possuem importância significativa (Liu et al., 2015). Um estudo realizado por Huang et al. (2013) abordou a utilização de matérias-primas de baixo custo, como melaço, águas residuais, gordura industrial e óleos vegetais, como fontes de carbono em aplicações industriais como produção de óleo intracelular, de etanol, ácido lático, entre outros.

3.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE LIPASE

Os resíduos provenientes da agroindústria são uma categoria importante de subprodutos resultantes das atividades agrícolas e industriais, sendo fundamental um manejo adequado para reduzir os impactos ambientais adversos (Sadh et al., 2018). Esses resíduos incluem materiais

oriundos de processos agrícolas, como cascas, palhas, bagaços e restos de culturas, bem como sobras geradas nas instalações agroindustriais, como subprodutos do processamento de alimentos, extração de óleos vegetais e processamento de fibras vegetais (Sánchez et al., 2022).

Dada a grande quantidade e diversidade desses resíduos, existe uma crescente necessidade de estratégias eficazes para aproveitá-los, a fim de minimizar seu impacto ambiental e maximizar o retorno econômico. Nesse contexto, pesquisas sobre abordagens biotecnológicas para transformar esses resíduos em produtos de valor agregado, como biocombustíveis, enzimas industriais e materiais biodegradáveis, está se destacando como uma área promissora (Mussato et al., 2012; Laufenberg et al., 2003; Selvakumar & Sivashanmugam, 2017). Dito isso, em estudos recentes (Farias et al., 2014; Souza et al., 2017; Pereira et al., 2019), a bioconversão de resíduos da indústria alimentícia para a produção de lipase vem recebendo bastante atenção e com resultados interessantes por meio do uso da levedura *Yarrowia lipolytica*.

Pereira et al. (2019) estudaram a produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* por fermentação submersa e utilizaram semente e casca de manga (tegumento fibroso, amêndoa e casca) como meio de cultivo. Os autores observaram uma atividade lipásica de aproximadamente 3500 U/L quando o tegumento fibroso foi suplementado com extrato de levedura. Farias et al. (2014) utilizaram tortas de algodão e soja como substratos para a produção de lipase microbiana por *Y. lipolytica* através da fermentação em estado sólido e observaram uma atividade de 139 ± 3 U/g em 14 h de fermentação e 102 ± 6 U/g em 28 h de fermentação, respectivamente.

Souza et al. (2017) utilizaram torta de canola e farelo de soja como substrato para a produção de lipase por meio de fermentação em estado sólido e demonstram que a *Y. lipolytica* pode produzir lipase em ambas as matérias-primas, com atividades lipásicas de $72,6 \pm 2,4$ U/g em 28h de fermentação e $93,9 \pm 2,9$ U/g em 14 de fermentação, respectivamente (ambos os meios foram suplementados com azeite de oliva).

3.3.1 Resíduo da extração do óleo da semente de romã

A Romã (*Punica granatum* L.) é uma árvore frutífera pertencente à família Lythraceae, anteriormente pertencente à família Punicaceae (Magangana et al., 2020). Possui origem no oriente Médio há cerca de 5000 mil anos atrás (Pérsia e áreas próximas) e foi distribuída da área do Mediterrâneo até o leste da Ásia na antiguidade (De Candolle, 1883; Adsule & Patil 2005; Levin, 2006). Essa fruta foi cultivada no antigo Egito e no início da Grécia e Itália, e com o passar do tempo, houve uma disseminação geográfica para diversas áreas, incluindo o

Turcomenistão, Afeganistão, Índia, China, entre outras regiões da Ásia, além do Norte da África e do Mediterrâneo Europeu (Chandra et al., 2010).

A romã é uma das frutas antigas mais associadas a diversas culturas e mitologias, há menções na Bíblia, no Corão, assim como nas artes budistas e chinesas (Chandra et al., 2010). Além da sua história e diversas propriedades medicinais, a romã possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticarcinogênicas e a tornam uma alternativa importante para a prevenção e o tratamento do câncer (Sharma et al., 2017) como também em aplicações da romã de seus derivados (Tabela 2).

Tabela 2 - Estudos de romã relacionados à saúde em humanos

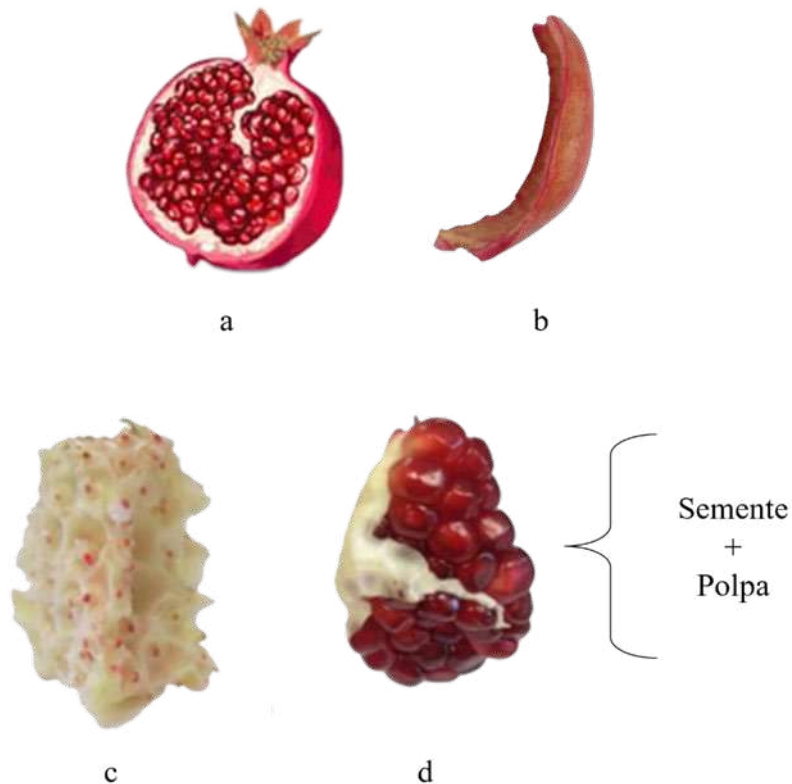
Derivado	Efeito
Extrato de fruta inteira	Efeito anti-inflamatório, diminuição do peso corporal, da glicemia sérica, do colesterol total e LDL e aumento do HDL, em paciente com sobrepeso e obesidade.
Suco	Melhora da pressão arterial, triglicerídeos séricos, HDL, estresse oxidativo e inflamação; Diminuição do nível sérico de eritropoetina; Diminuição da pressão arterial sistólica e diastólica; Mantém as habilidades de memória visual; Diminuição da modulação de danos de gordura e proteína; Diminuição dos parâmetros de pressão arterial sistólica, creatinina e dano muscular.
Óleo de semente	Diminuição dos níveis de açúcar no sangue em jejum
Extrato de casca	Potencial hipolipêmico, hipoglicêmico e antioxidante; Diminuição da pressão arterial sistólica, LDL, colesterol total, aumento do HDL.
Romã microencapsulada	Reverte a disfunção endotelial induzida pela lipoproteína de alta densidade e a trigliceridemia pós-prandial.

Adaptado de: Kandyliis & Kokkinomagoulos (2020).

Botanicamente, a romã é caracterizada por sua estrutura e composição distintas. As folhas possuem cor verde brilhante e geralmente de formato oval ou lanceolado. As flores da romã são vermelhas brilhantes, geralmente com cinco pétalas, e são altamente ornamentais (Coronado-Reyes et al., 2021). As árvores de romã podem florescer durante todo o ano em climas tropicais e em regiões subtropicais com estações de floração distintas podem florescer uma vez ao ano, (Kumar et al., 2020).

O fruto da romã é composto por uma casca dura e espessa, sendo chamada de epicarpo, que varia de cor de acordo com a maturação, podendo apresentar tons que vão do verde ao vermelho ou amarelo (Coronado-Reyes et al., 2021). Logo abaixo do epicarpo, encontra-se uma camada esponjosa e branca, conhecida como mesocarpo, essa parte intermediária da casca é rica em compostos fenólicos e fibras, contribuindo para a textura e sabor característicos da fruta. Internamente, a romã é dividida por membranas em compartimentos individuais chamados arilos, que são comestíveis e são utilizados na produção de suco de romã. Dentro desses compartimentos, estão localizadas as sementes que são utilizadas para a obtenção do óleo da semente, rico em ácidos graxos (Benedetti et al., 2023) (Figura 3).

Figura 3 – Estrutura da romã



Fonte: Adaptado de Benedetti et al. (2023) & Mukama et al. (2019).

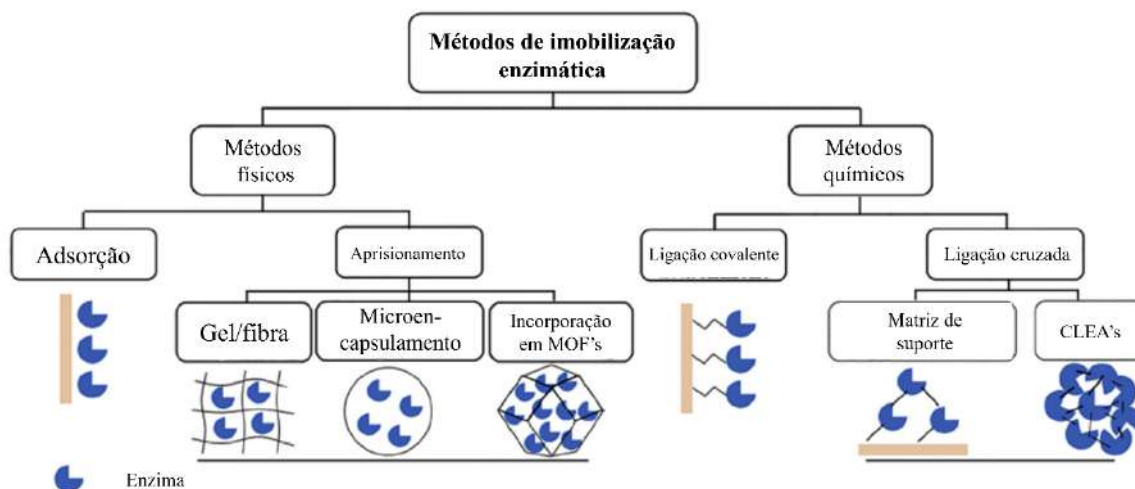
Vários estudos têm explorado a extração de óleo de semente de romã, utilizando diferentes métodos e condições, obtendo resultados diversos. De acordo com Abbasi (2008), a utilização de solventes orgânicos e CO₂ supercrítico na extração resultou em rendimentos variados e composições diferentes de ácidos graxos. Goula (2013) fez uma otimização adicional do processo, empregando a assistência de ultrassom, identificando fatores como tamanho das partículas das sementes, temperatura da extração e proporção entre o solvente e o sólido como determinantes-chave para o rendimento da extração. Ahangari (2012) comparou o uso do propano subcrítico com o dióxido de carbono supercrítico para a extração do óleo, observando que o propano subcrítico apresentava maiores rendimentos. Por fim, Rojo-Gutiérrez (2021) avaliou os efeitos das extrações assistidas por micro-ondas e ultrassom, concluindo que temperatura e proporção entre solvente e amostra foram os principais fatores que influenciaram no rendimento da extração. Durante o processo de extração do óleo, ocorre a geração de subprodutos como o resíduo, por exemplo.

Resíduos são gerados em grandes quantidades anualmente, então a reutilização para esses subprodutos, que possuem baixo custo e podem ser utilizados como fonte de carbono, nitrogênio e minerais, vem sendo bastante estudado (Mussato et al., 2012). A partir do exposto, podemos inferir que a utilização de resíduos agroindustriais é uma alternativa para a produção de lipase extracelular. Durante a fermentação de resíduos por fermentação submersa, podemos obter dois produtos com valor agregado, o extrato enzimático bruto (enzima livre) e o sólido fermentado contendo a enzima adsorvida (enzima imobilizada).

3.4 IMOBILIZAÇÃO NATURAL DE LIPASE

A imobilização enzimática é um processo que possibilita melhorar e maximizar a atividade de enzimas, assim como prolongar sua atividade, melhorando sua aplicação em processos industriais (Bhavanirama et al., 2019). Para isso, diversas técnicas podem ser utilizadas para aprisionar/imobilizar a enzima, sendo classificadas conforme os tipos de interação em métodos químicos (ligação covalente e reticulação) e físicos (adsorção e aprisionamento), cada uma com distintas interações entre enzimas e suportes (Figura 4) (Liu et al., 2018).

Figura 4 – Técnicas de imobilização enzimática.



Fonte: Adaptado de Lui et al. (2018).

A imobilização natural de enzimas em resíduos agroindustriais, durante o processo fermentativo, normalmente acontece por adsorção física. Este processo implica na fixação espontânea da lipase nas partículas sólidas dos resíduos, conferindo vantagens adicionais à estratégia de produção. Esta imobilização, muitas vezes, resulta em uma maior estabilidade da enzima durante o processo fermentativo, possibilitando a reutilização ao longo de múltiplos ciclos de reuso (Todo Bom et al., 2020; Pereira et al, 2019; Aguiéiras et al., 2014; Aguiéiras et al., 2019).

A abordagem de imobilização natural não só simplifica os processos de recuperação de enzimas, como também oferece uma alternativa sustentável às técnicas convencionais de imobilização, que muitas vezes envolvem o uso de suportes químicos ou sintéticos e reduz o custo o custo da sua produção, facilitando sua aplicação (Sousa et al., 2022; Ojeda-Hernández et al, 2018).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O Resíduo da Semente de Romã (RSR) utilizado nas fermentações foi fornecido pelo Laboratório de Bioquímica Alimentar e Nutricional da Universidade Federal do Rio de Janeiro, após estudo de extração do óleo (Silva et al., 2019). O RSR foi previamente seco em estufa Fabbe-Primar (modelo 219) a 65 °C e depois moído em moinho de laboratório. A farinha foi peneirada em peneira de malha 0,80 mm e armazenada em sacos de polietileno até o momento de sua utilização. A Peptona e o extrato de levedura utilizados foram obtidos da Kasvi (Paraná, Brasil). A ureia, o cloreto de amônio, o sulfato de amônio, o fosfato de potássio e o *p*-nitrofenil laurato foram obtidos da Sigma Aldrich Brasil. Triptona foi adquirida da Himedia (Mumbai, Índia) e a milhocina foi cedida pela Ingredion Brasil. O dimetilsulfóxido foi obtido da Isofar (Rio de Janeiro, Brasil).

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO RSR

A análise da composição centesimal do RSR foi realizada de acordo com os métodos descritos pelo Instituto Adolfo Lutz (Zenebon et al., 2008) e Métodos Oficiais de Análise da AOAC Internacional (Horwitz & George, 2005). Foram determinados os seguintes parâmetros: umidade, lipídios, cinzas, proteínas e carboidratos totais por diferença (Nifext). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.3 PRODUÇÃO DE LIPASE

4.3.1 Preparação de cepa e pré-inóculo

Uma linhagem selvagem de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682), isolada da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro (Brasil), foi utilizada para produzir a lipase (Hagler e Mendonça-Hagler, 1981). As células foram pré-cultivadas em meio YPD (p/v: 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose), a 28 °C, 160 rpm, por 72 h. As células pré-cultivadas foram utilizadas em quantidades suficientes para iniciar a produção de lipase com 1 g de células (peso seco)/L.

4.3.2 Produção de Lipase em Frascos *Erlenmeyer*

A produção de lipase em frascos *Erlenmeyer* foi realizada em frascos de 250 mL contendo 60 mL de meio de produção. Em experimentos preliminares, o meio de produção de

lipase foi preparado com água destilada e RSR, 25 g/L, com e sem diferentes fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio (ureia, cloreto de amônio, sulfato de amônio, milhocina, extrato de levedura, triptona, triptona de soja, peptona, peptona/extrato de levedura e ureia/extrato de levedura) em uma concentração fixa de 2 g/L. A combinação das melhores fontes foi testada preliminarmente em concentrações crescentes (até 4 g/L).

Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2², com três repetições no ponto central, foi utilizado para avaliar as concentrações ideais das melhores fontes de nitrogênio (ureia e extrato de levedura) para produção de lipase com RSR (Tabela 3). Extrato de levedura e ureia foram as variáveis independentes com concentrações descritas na Tabela 3. Cinco níveis de cada fator (-1,41; -1; 0; +1; +1,41) foram utilizados e a combinação entre eles resultou num total de 11 ensaios: 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 pontos centrais.

Tabela 3 - Níveis e variáveis analisadas no Delineamento Composto Central Rotacional para avaliação das concentrações ideais das melhores fontes de nitrogênio para produção de lipase.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Extrato de levedura (%)	1,6	2,0	3,0	4,0	4,4
Ureia (%)	0,1	0,5	1,5	2,5	2,9

Todos os cultivos foram inoculados com 1 g de peso seco de células/L e incubados a 28 °C em agitador rotativo a 250 rpm por 70 h. Amostras foram coletadas durante toda a fermentação para determinar a atividade lipolítica extracelular, após centrifugação a 2000 g.

4.3.3 Produção de Lipase em Biorreator

O melhor meio de cultura para produção de lipase, determinado em frascos *Erlenmeyer*, foi utilizado em processo de produção em escala de bancada, com biorreator New Brunswick Microferm MF-114 (volume efetivo de 3,5 L). A produção de lipase foi realizada com agitação mecânica de 600 rpm, taxa de aeração de 1,5 L.min⁻¹ e temperatura de 28 °C, por 90 h. Amostras coletadas a cada 6 h foram centrifugadas a 4 °C, 2.000 g por 5 min, e o sobrenadante obtido congelado a -20 °C para posterior avaliação da atividade da lipase extracelular.

Uma vez determinado o tempo para atividade máxima da lipase extracelular em experimentos que duraram 90 horas com quantidade amostral de 5 mL, a produção da lipase foi realizada novamente nas mesmas condições, mas sem a retirada de amostras e estocagem de todo o meio livre de células e do resíduo sólido fermentado, após o tempo determinado. Este

procedimento foi seguido para obter um maior volume de extrato bruto de lipase com alta atividade e de resíduo fermentado da semente de romã (fermRSR). Posteriormente, o fermRSR foi liofilizado (LC 1500, Terroni, São Carlos, Brasil) para avaliação como um biocatalisador imobilizado.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DE RESÍDUO DE SEMENTE DE ROMÃ FERMENTADO LIOFILIZADO (fermRSR)

4.4.1 Caracterização físico-química de fermRSR liofilizado

O fermRSR liofilizado foi avaliado quanto ao teor de proteína (descrito na Seção 4.2) e quanto a morfologia em um microscópio óptico (Nikon, modelo Eclipse E100LED) para verificar a possível adesão de células na superfície do material.

4.4.2 Parâmetros cinéticos do fermRSR liofilizado

Os parâmetros cinéticos, constante de Michaelis-Menten (K_m) e taxa máxima de reação (V_{max}) do fermRSR liofilizado foram determinados a partir de reações de hidrólise *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL), com concentrações de substrato variando de 20 a 3000 μ M. O extrato bruto extracelular também foi testado para comparação. A reação de hidrólise foi realizada em cubeta de 1 mililitro em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1800) a 37 °C por 100 segundos e a absorbância de 410 nm foi registrada para monitorar a produção de *p*-nitrofenol. O K_m e V_{max} foram obtidos usando uma regressão não linear da taxa de reação versus dados de concentração do substrato usando o modelo cinético de Michaelis-Menten. A energia livre de ligação do substrato (ΔG_{E-S}), o número de *turnover* (número de renovação) (K_{cat}) e a energia livre do estado de transição (ΔG_{E-T}) também foram determinados, conforme mostrado nas Equações (1) – (3) (Sabiq et al., 2010).

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{E_t} \quad (1)$$

$$\Delta G_{E-T} = -RT \ln \frac{K_{cat}}{K_m} \quad (2)$$

$$\Delta G_{E-S} = -RT \ln \frac{1}{K_m} \quad (3)$$

onde E_t é a concentração de proteína ($\mu\text{mol/mL}$), R é a constante universal do gás ideal ($8,314 \cdot 10^{-3} \text{ kJ/mol.K}$) e T é a temperatura experimental (310 K).

4.4.3 Reações de hidrólise e síntese utilizando fermRSR liofilizado como biocatalisador

Para a avaliação do fermRSR liofilizado como biocatalisador imobilizado, foram realizadas reações experimentais de hidrólise e síntese. Os experimentos de hidrólise foram realizados usando *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL) como substrato,

Para os experimentos de síntese, a produção de lipídios estruturados por acidólise com azeite e ácido láurico (12:0) foi determinada seguindo metodologia descrita por Akil et al. (2020). As reações foram iniciadas pela adição de 200 mg de fermRSR liofilizado em mini reatores de 50 mililitros contendo 3,56 g de azeite (que contém triacilglicerol – TAG) e 1,6 g de ácido láurico (proporção molar 2:1: ácido láurico: TAG). Foi realizado um experimento controle com esta mesma proporção de TAG e ácido láurico, mas sem a enzima, que foi submetido às mesmas condições aqui descritas para as reações com a enzima. Os mini reatores foram mantidos a 37 °C por 15 min com agitação magnética a 500 rpm. Em seguida, o substrato reagido foi coletado e 3,0 mL de Na_2CO_3 5% (p/v) e 7,0 mL de metanol (99,99%) foram adicionados para interromper a reação e estimular a separação dos Lipídios Estruturados (LE) dos ácidos graxos livres. O meio reacional foi centrifugado a 3.000 g por 10 min a 25 °C e a fase superior contendo o LE foi armazenada. A composição de ácidos graxos do lipídeo estruturado formado foi determinada por cromatografia gasosa. A quantidade de ácido láurico obtida no experimento controle foi descontada dos resultados com a enzima.

4.5 REUTILIZAÇÃO DE fermRSR LIOFILIZADO EM REAÇÕES DE BIOCATÁLISE

A reutilização do fermRSR liofilizado como biocatalisador foi realizada pela determinação da concentração do produto (*p*-nitrofenol) após sucessivas reações (4 ciclos). Essas reações foram realizadas de acordo com a Seção 4.4.3 e, ao final de cada ciclo, o sistema reacional (substrato + biocatalisador) foi transferido para um tubo falcon de 50 mL e centrifugado a 2.000 g por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e o precipitado foi utilizado em um novo ciclo. A quantidade de produto formado no primeiro ciclo foi definida como 100%. Para avaliar a dessorção da enzima durante a reutilização, o fermRSR foi submetido a agitação magnética (500 rpm) em mini reatores com tampão fosfato a 37 °C por 60 min. A concentração de proteína foi determinada a cada 5 min.

4.6 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

4.6.1 Concentração celular

A concentração celular foi determinada medindo a densidade óptica em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1800) a 570 nm, com posterior conversão para peso seco celular (g p.s.cel) por mL usando uma curva padrão.

4.6.2 Atividade Lipolítica

A atividade da lipase do extrato extracelular da enzima bruta foi determinada monitorando a absorvância da produção de *p*-nitrofenol a 410 nm em um espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1800) a 37 °C por 100 segundos como resultado da hidrólise de *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL) (Pereira-Meirelles et al., 1997). Para o resíduo de semente de romã fermentado liofilizado (fermRSR), a atividade da lipase foi examinada adicionando 25 mL de *p*-NPL (560 µM) a 5 mg de fermRSR liofilizado. Esse sistema foi mantido sob agitação magnética a 37 °C por 5 min e a reação monitorada por meio da verificação da absorvância (410 nm) em intervalos de 30 s por 5 min. Uma unidade de atividade de lipase (U) é equivalente à quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de *p*-nitrofenol/min.

$$A = \frac{(\Delta Abs) * D * f * V_r}{(\Delta t) * V_s} \quad (4)$$

onde A é a atividade da enzima (U.L-1), onde 1 Unidade enzimática (1U) corresponde a quantidade de enzima capaz de produzir 1µmol de *p*-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio; ΔAbs é a variação de absorvância no intervalo de tempo Δt (minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear da absorvância; D é a diluição da solução enzimática; Vr é o volume reacional, que é o volume da solução de *p*-NPL em tampão e o volume da amostra, em litros; Vs é o volume da solução enzimática utilizada no ensaio, em litros; f é o fator de conversão (245 µmol/L), obtido através da construção de uma curva padrão de *p*-NFL em concentração variando entre 0,01 e 0,2 µmol.mL⁻¹.

4.6.3 Determinação da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa (CG)

A composição de ácidos graxos do lipídeo estruturado produzido durante as reações de síntese foi determinada em um cromatógrafo a gás CG-2010 (Shimadzu, Japão) equipado com

uma entrada *split/splitless*, em uma coluna Omegawax CG (30 m 0,32 mm ID e 0,25 μm de espessura do filme) e um detector de ionização de chama (FID). Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs) foram preparados de acordo com Lepage et al. (1986) e injetados no CG. As identidades dos picos cromatográficos das amostras foram determinadas com base no tempo de retenção dos padrões comerciais FAME (Supelco 37 FAME mix, Sigma-Aldrich, Brasil). A eficiência de incorporação (%) de ácido láurico nos lipídios estruturados produzidos foi calculada a partir da área do pico.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais obtidos foram analisados estatisticamente com o software STATISTICA 7.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA). Os modelos obtidos foram verificados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e a significância determinada pelo teste estatístico de Fisher (Teste F), utilizando um nível de significância de 10 %. A variância explicada pelos modelos foi observada pelo coeficiente de determinação (R^2).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO RESÍDUO DE SEMENTE DE ROMÃ (RSR)

A Figura 5 mostra a imagem do RSR após a extração do óleo e após os processos de secagem e moagem. Esta farinha (Figura 5b) foi utilizada para produção de lipase em cultivo submerso. A composição centesimal da farinha de RSR revelou maior teor de carboidratos em relação aos lipídios e proteínas (Tabela 4). Ainda assim, os teores de lipídios e proteínas foram significativos e podem ajudar a fornecer nutrientes e indutores para o processo de produção de lipase.

Figura 5 – RSR após extração do óleo (a) e triturado para utilização em fermentações (b).



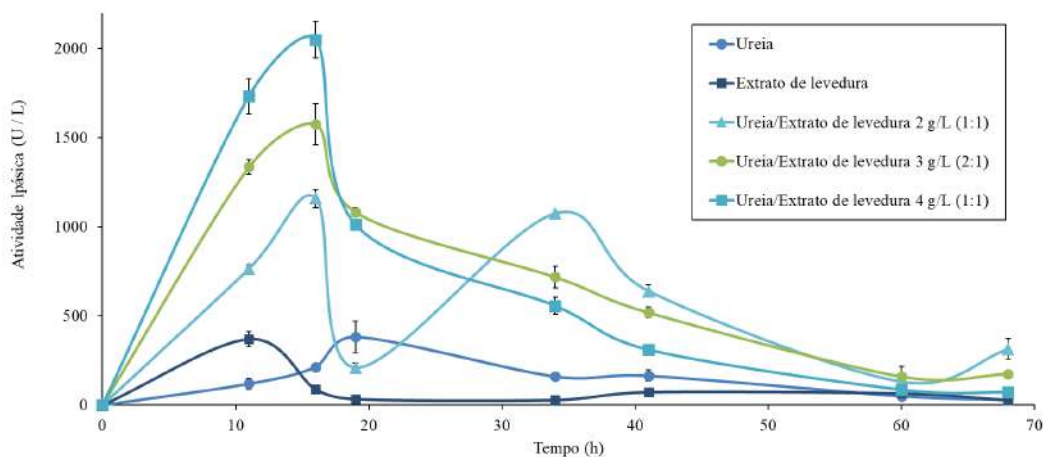
Fonte: O autor.

Tabela 4 - Composição centesimal do resíduo de semente de romã (RSR).

Constituinte	Concentração (%)
Umidade	8,65 ± 0,02
Proteína	12,57 ± 0,09
Lipídios	3,54 ± 0,34
Carboidratos	72,62 ± 0,83
Cinzas	2,49 ± 0,07

O teor de óleo da semente de romã (12 a 20%) reduziu para 3,54 no RSR, como esperado, uma vez que o RSR foi obtido por extração de óleo (Silva et al., 2019). No entanto, um pouco de óleo permaneceu neste resíduo, o que foi potencialmente positivo para a produção de lipase microbiana.

Figura 7 - Perfil cinético da atividade da lipase extracelular durante cultivo submerso de *Yarrowia lipolytica* em frascos Erlenmeyer com resíduo de semente de romã (RSR) utilizando melhores fontes de nitrogênio (ureia e extrato de levedura) e suas combinações.



As melhores fontes de nitrogênio (utilizadas individualmente) para a produção de lipase foram o extrato de levedura e a ureia, com produção máxima após 11 h para o extrato de levedura (369 U/L) e após 19 h para a ureia (383 U/L) (Figura 6). O extrato de levedura é eficaz na suplementação do meio de cultura porque é uma boa fonte de nitrogênio e também fornece vitaminas importantes para o crescimento celular (Li et al., 2004). Galvagno et al. (2011) e Novotný et al. (1988) também mostraram que o extrato de levedura e a ureia aumentam significativamente a produção de lipase de *Y. lipolytica*. Os diferentes tempos máximos de produção detectados para as fontes de nitrogênio (Figura 6) provavelmente se devem à secreção de lipases para o meio extracelular, que geralmente ocorre quando a fonte de carbono é escassa, e a fonte de nitrogênio exerce influência direta nesse processo (Nunes et al., 2021). Cloreto de amônio, sulfato de amônio, milhocina, triptona, triptona de soja e peptona não foram eficazes na produção de lipase extracelular a partir de RSR nas condições estudadas. Mesmo a combinação de peptona e extrato de levedura, normalmente encontrada em meios de produção de lipase (Nunes et al., 2021), não foi tão eficaz quanto o extrato de levedura ou a ureia. A produção de lipase com extrato de levedura, sem RSR, foi realizada para verificar se esta fonte de nitrogênio, que também é fonte de carbono, é suficiente para a produção da enzima. No entanto, foi detectada baixa atividade lipolítica (máximo 90 U/L após 20 h), evidenciando que o RSR é fundamental para a produção de lipase.

Como o extrato de levedura e a ureia foram as fontes de nitrogênio que apresentaram os melhores resultados na produção de lipase, esses compostos foram testados simultaneamente (Figura 7). Os resultados confirmaram a importância de ambas as fontes de nitrogênio juntas (ureia/extrato de levedura, 2 g/L (1:1); ureia/extrato de levedura, 3 g/L (2:1); e ureia/extrato de levedura, 4 g/L (1:1)), com os valores de atividade da lipase aumentando de acordo com sua concentração (1160 U/L, 2 g/L; 1576 U/L, 3 g/L; 2051 U/L, 4 g/L). Parece que a produção de lipase foi maior na interseção (após 16 h) entre os valores máximos de produção individuais (11 e 19 h), mostrando o efeito sinérgico dos compostos. Nesse sentido, um delineamento composto central rotacional foi proposto para avaliar a influência desse efeito sinérgico na produção de lipase, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5- Matriz de execuções experimentais para o Delineamento Composto Central rotacional para produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* cultivada em frascos Erlenmeyer por 16 h em resíduo de semente de romã (RSR) suplementado com extrato de levedura e ureia.

Ensaio	Extrato de levedura (%)	Ureia (%)	Atividade Lipásica (U/L)
1	2,0 ₍₋₁₎	0,5 ₍₋₁₎	13120,81
2	2,0 ₍₋₁₎	2,5 ₍₊₁₎	502,45
3	4,0 ₍₊₁₎	0,5 ₍₋₁₎	11685,13
4	4,0 ₍₊₁₎	2,5 ₍₊₁₎	530,41
5	1,6 _(-1,41)	1,5 ₍₀₎	10450,85
6	4,4 _(+1,41)	1,5 ₍₀₎	3127,25
7	3,0 ₍₀₎	0,1 _(-1,41)	14161,17
8	3,0 ₍₀₎	2,9 _(+1,41)	285,55
9 (C)	3,0 ₍₀₎	1,5 ₍₀₎	9990,86
10 (C)	3,0 ₍₀₎	1,5 ₍₀₎	7615,04
11 (C)	3,0 ₍₀₎	1,5 ₍₀₎	8191,85

C: Ponto Central

A atividade da lipase extracelular variou de 285,55 (5,9 g/L de fonte de nitrogênio) a 14.161,17 U/L (3,1 g/L de fonte de nitrogênio), o que foi significativamente superior à variação nos pontos centrais (7615,04 a 9990,86) (Tabela 5) indicando que as diferentes concentrações das fontes de nitrogênio influenciaram a produção de lipase. Também é possível observar que quando a concentração de ureia foi maior que a concentração de extrato de levedura, a atividade da lipase reduziu significativamente (pelo menos 16 vezes). A análise de variância e a importância dos efeitos foram verificadas por meio do teste de Fisher (teste F), com nível de

significância de 10%. O modelo com os efeitos lineares e quadráticos das variáveis não foi significativo e, portanto, termos não significativos foram eliminados. Esta nova ANOVA é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para o delineamento composto central rotacional para produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* cultivada em frasco Erlenmeyer por 16 h com resíduo de semente de romã (RSR) suplementado com extrato de levedura e ureia

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	p	R ²
Extrato de levedura (L)	17.301.489	1	17.301.489	11,2669	0,0784	0,913
Ureia (L)	235.403.403	1	235.403.403	153,2965	0,0065	
Falta de Ajuste	21.085.205	6	3.514.201	2,2885	0,3351	
Erro Puro	3.071.216	2	1.535.608			
Total	276.861.314	10				

SQ: Soma dos quadrados. DF: Grau de liberdade. L: Termo linear. F: Teste para comparação da variância do modelo com a variância residual (erro). R²: Coeficiente de determinação.

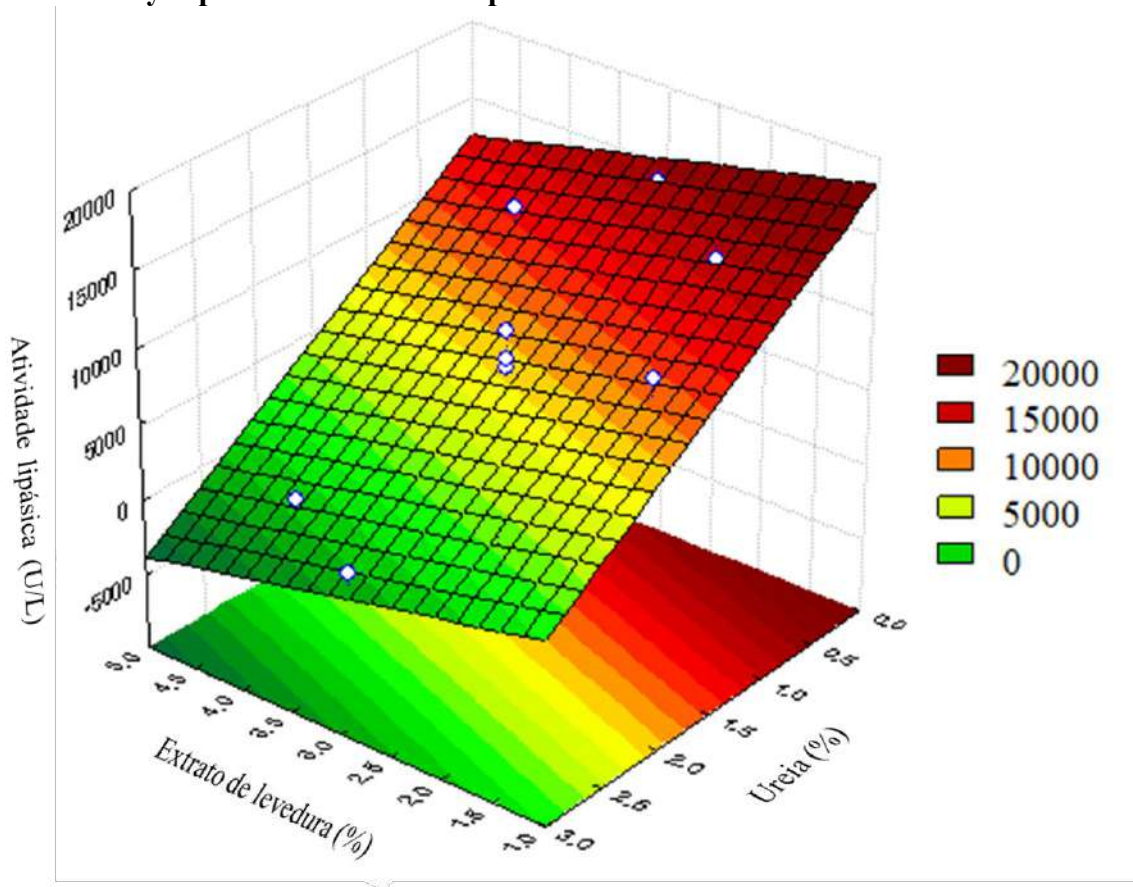
O modelo reduzido não teve falta de ajuste significativa ($p > 0,10$), o que indica que descreveu adequadamente o processo (Tabela 6). O alto valor de R² (0,913) também revelou uma boa correlação entre os dados experimentais e preditos. A equação 4 representa o modelo matemático com variáveis reais (extrato de levedura e concentração de ureia) para a atividade da lipase.

$$AL (U/L) = 19790,55 - 1470,61EL - 5424,52U \quad (4)$$

onde AL é a atividade da lipase em 16 h de fermentação, e EL e U representam os valores das concentrações de extrato de levedura e ureia, respectivamente.

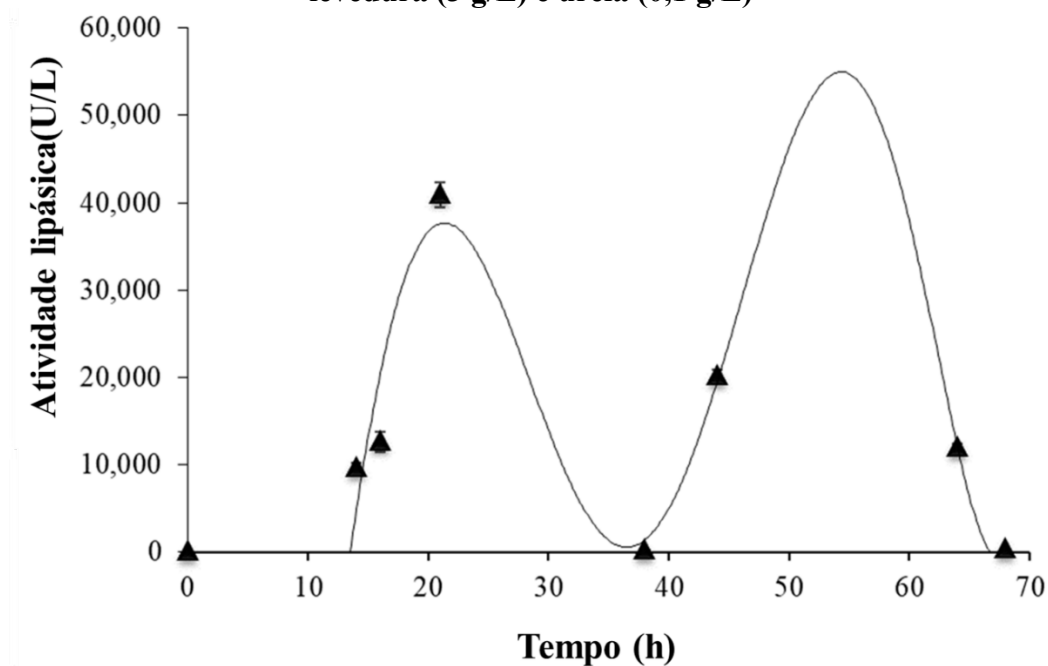
Devido à não significância dos termos quadráticos do modelo, o valor ótimo para produção de lipase não foi determinado (Figura 7). Entretanto, houve uma tendência de aumento da atividade da lipase quando a concentração de ureia tendeu a valores menores (<0,5 g/L) e a concentração de extrato de levedura atingiu valores médios (3,0 g/L). Nessas condições, a produção de lipase foi de aproximadamente 14.000 U/L.

Figura 8 – Superfície de resposta do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* cultivada em frasco Erlenmeyer por 16 h com RSR suplementado com extrato de levedura e ureia.



A melhor combinação de extrato de levedura e ureia (3,0 g/L e 0,1 g/L, respectivamente) foi utilizada para o cultivo submerso de *Y. lipolytica* em biorreator, para produção de lipase (Figura 9). Uma atividade de lipase extracelular de aproximadamente 40.000 U/L foi detectada após 21 h de cultivo. O segundo possível pico de lipase (50-60 h) pode estar relacionado a outras lipases produzidas por esta levedura, como as lipases associadas à parede celular, que podem ser liberadas para o meio extracelular quando a fonte de carbono é escassa (Nunes et al., 2021). Porém, a produtividade teria sido menor, o que nos levou a optar pela produção de lipase em biorreator após 21 h de cultivo.

Figura 9 – Perfil cinético da atividade da lipase extracelular durante cultivo submerso de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 3,5 litros com RSR com extrato de levedura (3 g/L) e ureia (0,1 g/L)



O resíduo sólido obtido após 21 h de cultivo nessas condições foi centrifugado e separado do sobrenadante contendo a lipase extracelular e das células que formaram uma camada entre o sobrenadante e o sólido. Posteriormente, esse resíduo sólido foi liofilizado; o produto, que é referido neste estudo como resíduo fermentado da semente de romã (fermRSR liofilizado), foi testado quanto à atividade da lipase. Uma alta atividade hidrolítica em *p*-NPL foi detectada para este sólido ($69,83 \pm 8,84$ U/g) e, portanto, foi utilizado como biocatalisador em testes posteriores. Um teste de controle foi realizado com RSR e nenhuma atividade foi detectada.

5.3 RESÍDUO DE SEMENTES DE ROMÃ FERMENTADO (fermRSR) COMO BIOCATALISADOR

A concentração proteica do fermRSR liofilizado foi determinada para verificar se ocorreu enriquecimento proteico a partir da adsorção de enzimas ou células, mas não foi observada diferença significativa entre a concentração proteica antes e depois do processo de fermentação, provavelmente devido à capacidade de detecção do método. A visualização do RSR e do fermRSR em microscópio óptico não revelou nenhuma alteração significativa na morfologia da superfície após o crescimento de *Y. lipolytica*, nem mesmo a presença de células aderentes (dados não mostrados). É importante pontuar também que não foi observada atividade

lipásica associada às células separadas do sólido fermentado. Estes resultados reforçam o argumento de que a atividade enzimática encontrada no resíduo sólido após o processo de fermentação foi devida à adsorção física das lipases neste suporte e não às células de *Y. lipolytica*.

A influência da concentração do substrato (*p*-NPL) na atividade lipásica do fermRSR (biocatalisador imobilizado) também foi determinada. O modelo cinético não linear de Michaelis-Menten foi utilizado para obter os parâmetros cinéticos aparentes V_{max} e K_m (Tabela 7). Foram encontrados valores elevados para os coeficientes de determinação para o ajuste deste modelo ($R^2 = 0,978$). O número de renovação (K_{cat}), a energia livre de ligação do substrato de (ΔG_{E-S}) e energia livre de ligação do estado de transição (ΔG_{E-T}) também foram calculados (Tabela 7).

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a lipase imobilizada (fermRSR liofilizada).

Parâmetros	Valor
V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$)	49,47
K_m ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	206,96
K_{cat} (s^{-1})	129,83
ΔG_{E-S} ($\text{kJ}/\mu\text{mol}$)	13,72
ΔG_{E-T} ($\text{kJ}/\mu\text{mol}$)	1,2

V_{max} : Taxa máxima de reação. K_m : Constante de Michaelis-Menten. K_{cat} : Número de Renovação. ΔG_{E-S} : Ligação de substrato de energia livre. ΔG_{E-T} : Energia livre de ligação do estado de transição. fermPSR: Resíduo fermentado de semente de romã.

O V_{max} calculado por grama de biocatalisador (fermRSR) foi baixo em comparação com outras lipases imobilizadas de *Y. lipolytica* (175 U/mg de proteína de lipase imobilizada em esferas de quitosana-alginato (Novotný et al., 1988), 731 U/g de lipase imobilizada em debris celular (Fraga et al., 2020) e 2.904 U/g de lipase imobilizada em nanopartículas magnéticas (Carvalho et al., 2020). Porém, para K_m , foi observado um valor inferior (0,21 mM) para o fermRSR em relação às demais lipases de *Y. lipolytica* imobilizadas (2,52 mM, (Fraga et al., 2020); 0,93 mM, (Carvalho et al., 2020), o que revela a maior afinidade deste biocatalisador em direção ao substrato. Pereira et al. (2019) observaram redução na afinidade enzima-substrato com o encapsulamento da lipase de *Y. lipolytica* nas esferas de alginato e quitosana. No entanto, o K_m obtido para o biocatalisador imobilizado (0,04 mM) foi inferior ao fermRSR. O número

de Renovação (K_{cat}) detectado para o fermRSR foi baixo, considerando que para todas as enzimas varia entre 1 a 10^4 s^{-1} , mas não ficou muito distante da lipase de *Y. lipolytica* encapsulada nas esferas de alginato e quitosana ($606 s^{-1}$). A ligação de energia livre-substrato (ΔG_{E-S}) revelou que a lipase livre ($8,7$ $kJ/\mu mol$, Novotný et al., 1988) precisava de uma quantidade menor de energia para a formação do complexo enzima-substrato do que o fermRSR. A energia livre da ligação do estado de transição (ΔG_{E-T}) indicou maior espontaneidade de reação para a lipase livre ($18,9$ $kJ/\mu mol$, (Novotný et al., 1988). No entanto, a possibilidade de reutilização do catalisador imobilizado favorece a sua escolha.

5.4 REAÇÕES DE HIDRÓLISE E SÍNTESE COM fermRSR LIOFILIZADO

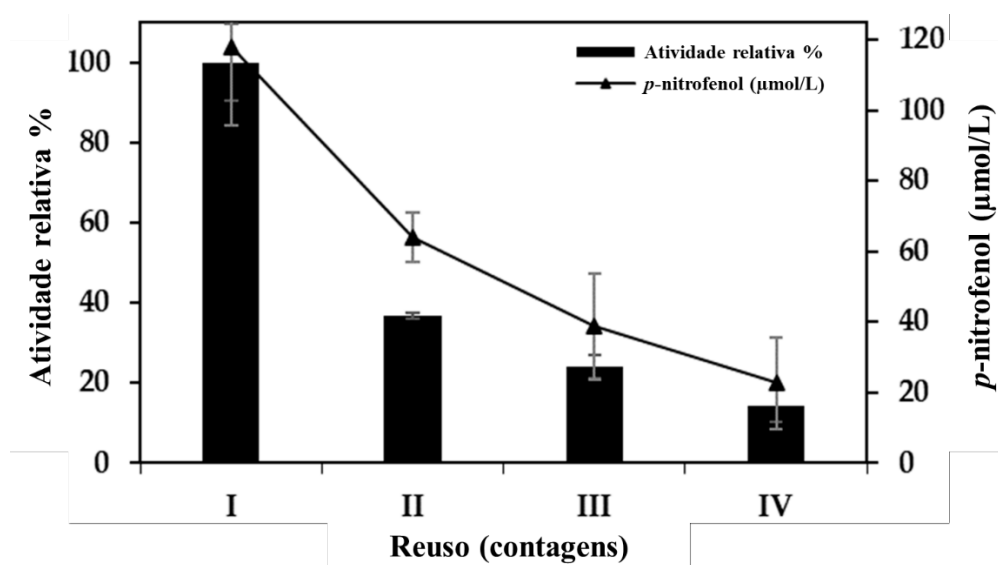
O fermRSR liofilizado foi utilizado na hidrólise do *p*-NPL e na síntese de lipídios estruturados (azeite + ácido láurico). Para a reação de hidrólise, foi alcançada a produção de aproximadamente $120,0 \pm 22,3$ $\mu mol/L$ de *p*-nitrofenol em 10 min de reação, o que correspondeu a 24,4% do rendimento teórico possível.

Os lipídios estruturados (LEs) são triacilgliceróis que foram reestruturados para alterar a posição e a composição dos ácidos graxos de sua forma original (Akil et al., 2020). Neste teste, optou-se por produzir LEs com um ácido graxo de cadeia média (ácido láurico, 12:0) esterificado nas posições sn-1 e sn-3 e um ácido graxo insaturado de cadeia longa (ácido oleico, 18:1 n-9) esterificado na posição sn-2 da estrutura do glicerol. Nesse sentido, utilizou-se azeite – composto em sua maioria por triacilgliceróis com ácido oleico em todas as posições – e ácido láurico, um ácido graxo de cadeia média. Ao adicionar uma lipase estritamente 1,3-regiosseletiva (lipase de *Y. lipolytica*) (Akil et al., 2020), o ácido láurico provavelmente teria sido incorporado exclusivamente em LE sn-1 e sn-3. Para a síntese de lipídios estruturados, foi observada uma eficiência de incorporação de aproximadamente 9,0-1,9% após 15 min de reação. Akil et al. (2020) encontraram uma eficiência de incorporação ideal de 30% ao produzir lipídios estruturados usando lipase de *Y. lipolytica* imobilizada em esferas de quitosana-alginato como biocatalisador. Embora a eficiência de incorporação não tenha sido tão alta com o fermRSR, esses experimentos mostraram que é possível utilizar este biocatalisador na síntese de lipídios estruturados. Além disso, é importante mencionar que não foi realizada uma otimização das condições reacionais para o fermRSR, o que poderia ter melhorado estes resultados.

5.5 REUTILIZAÇÃO DE fermRSR LIOFILIZADO EM HIDRÓLISE

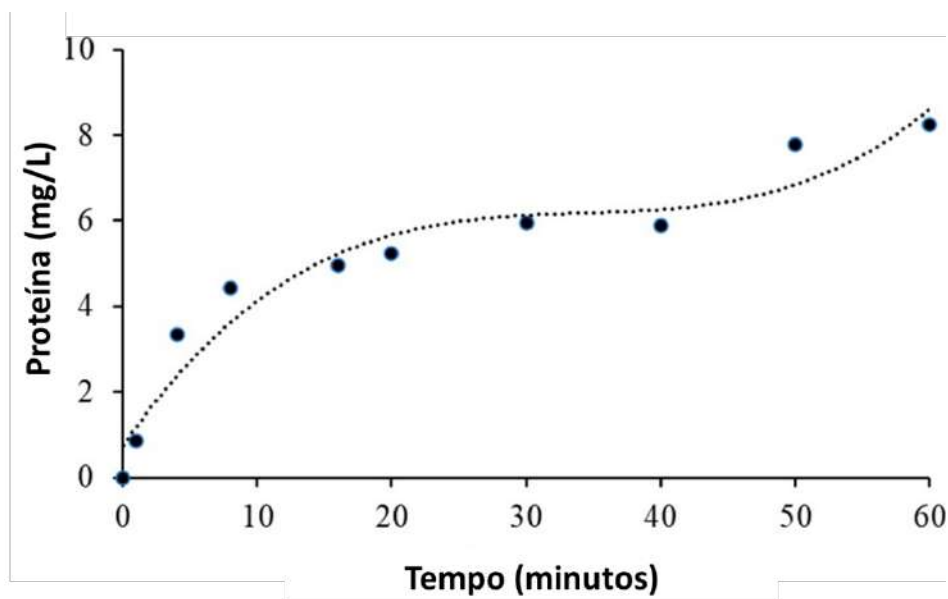
Para explorar o reaproveitamento do novo biocatalisador, foram testados quatro ciclos de reação nas reações de hidrólise. A Figura 10 mostra a reutilização do fermRSR na hidrólise do *p*-NPL.

Figura 10 - Reutilização de fermRSR em reação de hidrólise com laurato de *p*-nitrofenila. A atividade enzimática do primeiro ciclo foi ajustada para 100%.



A atividade do novo biocatalisador reduziu em mais de 50% no segundo ciclo de reação e manteve aproximadamente 20% de sua atividade inicial após o quarto ciclo de reação. Isto provavelmente ocorre porque a imobilização natural da enzima durante a fermentação ocorreu através de adsorção física, o que resultou em uma ligação fraca entre a enzima e o suporte. Com menor quantidade de catalisador no suporte devido à dessorção, o aumento do tempo de reação poderia ter ajudado a atingir a concentração do produto do primeiro ciclo. Contudo, a concentração de *p*-nitrofenol também reduziu no segundo ciclo (aproximadamente 60%) após 10 min e, em reações sucessivas, diminuiu para aproximadamente 20%. O teste foi realizado utilizando mini reatores de agitação magnética com tampão fosfato e fermRSR a 37 °C. A Figura 10 apresenta a concentração de proteína na fase aquosa (tampão fosfato) durante 1 h de imersão da enzima no tampão com agitação de 500 rpm a 37°C, mimetizando as condições reacionais.

Figura 11 - Teste de dessorção do fermRSR em tampão fosfato a 37 °C com agitação magnética de 500 rpm.



O aumento na concentração proteica detectada no tampão evidencia a dessorção da enzima durante as reações. Apesar da redução considerável na atividade enzimática e na formação de produto, o uso do fermRSR na reação de hidrólise do *p*-nitrofenil laurato poderia ter sido vantajoso, uma vez que já havia sido utilizado para crescimento microbiano e foi novamente utilizado como biocatalisador.

6 CONCLUSÕES

O RSR sem suplementação de nitrogênio não foi suficiente para produzir lipase extracelular. Extrato de levedura e ureia foram as melhores fontes de nitrogênio testadas para complementar o RSR, com produção de lipase de 369 U/L e 383 U/L, respectivamente. Quando essas fontes foram combinadas, foi obtida uma atividade de aproximadamente 14.000 U/L e 40.000 U/L para culturas em frasco Erlenmeyer e biorreator, respectivamente. Uma alta atividade hidrolítica no p-NPL foi detectada no resíduo sólido após a fermentação – fermRSR (69,83 U/g). A determinação dos parâmetros cinéticos do fermRSR mostrou baixo V_{max} e boa afinidade pelo substrato (baixo K_m) em comparação com outras lipases de *Y. lipolytica* imobilizadas. A utilização do fermRSR na hidrólise do p-nitrofenil laurato apresentou bons resultados e a possibilidade de reaproveitamento deste biocatalisador nestas reações. A produção de lipídios estruturados utilizando o fermRSR foi baixa, mas possível. Portanto, os resultados aqui apresentados mostram que o RSR possui potencial significativo para utilização como meio de cultura para produção de lipase extracelular e também como suporte para a adsorção física de enzimas e formação de novos biocatalisadores.

7 PUBLICAÇÕES RESULTANTES DO PRESENTE TRABALHO

DINIZ, M. M.; PEREIRA, A. S.; ALBAGLI, G.; AMARAL, P. F. F. **Simultaneous Production and Immobilization of Lipase Using Pomegranate-Seed Residue: A New Biocatalyst for Hydrolysis Reactions and Structured Lipids Synthesis.** Fermentation-Basel, v. 8, p. 651, 2022.

DINIZ, M. M.; PEREIRA, A. S.; AMARAL, P. F. F. **Pomegranate seed oil extraction waste for extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*.** In: XXII National Bioprocesses Symposium (Sinaferm) XIII Enzymatic Hydrolysis Of Biomass Symposium (Sheb), 2019.

DINIZ, M. M.; PENHA, A. C. B.; PEREIRA, A. S.; AMARAL, P. F. F. **Utilização do resíduo da extração do óleo da semente de romã para produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*.** In: Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos e VII Encontro Paranaense de Engenharia de Alimentos, 2018, Guarapuava-PR. Engenharia de Alimentos, 2018.

DINIZ, M. M.; PEREIRA, A. S.; AMARAL, P. F. F. **Otimização da produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* utilizando resíduo da extração do óleo da semente de romã.** In: XLII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Tecnológica, Artística e Cultural (JICTAC 2020 - Edição Especial). 2020.

DINIZ, M. M.; PEREIRA, A. S.; AMARAL, P. F. F. **Resíduo da extração do óleo da semente de romã para produção de lipase extracelular por *Yarrowia lipolytica*.** In: SIAC (Sistema de Integração Acadêmica da UFRJ). 2019.

8 REFERÊNCIAS

- ABBASI, H.; REZAEI, K.; RASHIDI, L. **Extraction of Essential Oils From the Seeds of Pomegranate Using Organic Solvents and Supercritical CO₂**. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. (2007). 85(1), 83–89.
- ADSULE, RN; PATIL, N. B. **Pomegranate**. In: Salunkhe DK, Kadam SS (Eds) *Handbook of Fruit Sciences and Technology Production, Composition, Storage and Processing*, Marcel Dekker, New York, printed at Brijbasi Art Press Ltd. 2005.
- AGUIEIRAS, E.C.G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E.D.; DE CASTRO, A.M.; LANGONE, M.A.P.; FREIRE, D.M.G. **Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts**. *Fuel*. 2014, 135, 315–321.
- AGUIEIRAS, E.C.G.; DE BARROS, D.S.N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D.M.G. **Production of lipases in cottonseed meal and application of the fermented solid as biocatalyst in esterification and transesterification reactions**. *Renew. Energy*. 2019, 130, 574–581.
- AHANGARI, B.; SARGOLZAEI, J. **Extraction of pomegranate seed oil using subcritical propane and supercritical carbon dioxide**. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. (2012), 46, 258-265.
- AKIL, E.; DA, S. PEREIRA, A.; EL-BACHA, T.; AMARAL, P.F.F.; TORRES, A.G. **Efficient production of bioactive structured lipids by fast acidolysis catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase, free and immobilized in chitosan-alginate beads, in solvent-free medium**. *Int. J. Biol. Macromol*. 2020, 163, 910–918.
- ALMARAZ-SÁNCHEZ, I.; AMARO-REYES, A.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; MENDOZA-SÁNCHEZ, M. **Processing agroindustry by-products for obtaining value-added products and reducing environmental impact**. *J. Chem*. 2022, 2022, 3656932.
- Ali, S.; Khan, S.A.; Hamayun, M.; Lee, I.-J. **The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review**. *Microorganisms*. 2023, 11, 510.
- AVIRAM, M.; DORNFELD, L.; ROSENBLAT, M.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; COLEMAN, R.; HAYEK, T.; PRESSER, D.; FUHRMAN, B. **Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: Studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice**. *Am. J. Clin. Nutr*. 2000, 71, 1062–1076.
- BENEDETTI, G.; ZABINI, F.; TAGLIAVENTO, L.; MENEGUZZO, F.; CALDERONE, V.; TESTAI, L. **An Overview of the Health Benefits, Extraction Methods and Improving the Properties of Pomegranate. Antioxidants**. 2023; 12(7):1351.
- BHAVANIRAMYA, S.; VANAJOTHI, R.; VISHNUPRIYA, S.; PREMKUMAR, K.; AL-ABOODY, MS.; VIJAYAKUMAR, R.; BASKARAN, D. **Enzyme Immobilization on Nanomaterials for Biosensor and Biocatalyst in Food and Biomedical Industry**. *Curr Pharm Des*. 2019;25(24):2661-2676. doi: 10.2174/1381612825666190712181403. PMID: 31309885.

CARVALHO, T.; DA, S. PEREIRA, A.; BONOMO, R.C.F.; FRANCO, M.; FINOTELLI, P.V.; AMARAL, P.F.F. **Simple physical adsorption technique to immobilize *Yarrowia lipolytica* lipase purified by different methods on magnetic nanoparticles: Adsorption isotherms and thermodynamic approach.** *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 160, 889–902.

CHANDRA, R., BABU, D., JADHAV, V., TEIXEIRA DA SILVA, J. **Origin, History and Domestication of Pomegranate. Fruit.** *Vegetable and Cereal Science and Biotechnology.* (2010). 4. 1-6.

CHOUDHURY, P.; BHUNIA, B. **Industrial application of lipase: A review.** *Biopharm Journal.* 2015, 1(2), 41-47.

CORONADO-REYES, J. A.; CORTÉS-PENAGOS, C. de J.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C. **Chemical composition and great applications to the fruit of the pomegranate (*Punica granatum*): a review.** *Food Science and Technology.* (2022), 42, e29420.

DAS, A. J.; & KUMAR, R. **Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix.** *Bioresource Technology.* (2018), 260, 233–240.

DE CANDOLLE, A. **L'origine des plantes cultivees.** Reprint J. Laffitte. 1883.

ĐURĐEVIĆ, S.; MILOVANOVIC, S.; ŠAVIKIN, K.; RISTIC, M.; MENKOVIC, N.; PLJEVLJAKUŠIĆ, D.; PETROVIC, S.; BOGDANOVIC, A. **Improvement of supercritical CO₂ and n-hexane extraction of wild growing pomegranate seed oil by microwave pretreatment.** *Ind. Crops Prod.* 2017, 104, 21–27.

ELFALLEH, W.; YING, M.; NASRI, N.; SHENG-HUA, H.; GUASMI, F.; FERCHICHI, A. **Fatty acids from Tunisian and Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) seeds.** *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2011, 62, 200–206.

FARIAS M., VALONI E., CASTRO A., COELHO M. **Lipase Production by *Yarrowia lipolytica* in Solid State Fermentation Using Different Agro Industrial Residues.** *Chemical Engineering Transactions,* 38, 301-306. 2014.

FERNANDES, L.; PEREIRA, J.A.; LOPÉZ-CORTÉS, I.; SALAZAR, D.M.; RAMALHOSA, E.; CASAL, S. **Fatty acid, vitamin E and sterols composition of seed oils from nine different pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain.** *J. Food Compos. Anal.* 2015, 39, 13–22.

FRAGA, J.L.; DA PENHA, A.C.B.; AKIL, E.; SILVA, K.A.; AMARAL, P.F.F. **Catalytic and physical features of a naturally immobilized *Yarrowia lipolytica* lipase in cell debris (LipImDebri) displaying high thermostability.** *3 Biotech* 2020, 10, 454.

JAEGER, KE.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, BW.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. **Bacterial lipases.** *FEMS Microbiol Rev.* 1994 Sep;15(1):29-63

GALVAGNO, M.A.; IANNONE, L.J.; BIANCHI, J.; KRONBERG, F.; ROST, E.; CARSTENS, M.R.; CERRUTTI, P. **Optimization of biomass production of a mutant of *Yarrowia lipolytica* with an increased lipase activity using raw glycerol.** *Rev. Argent. Microbiol.* 2011, 43, 218–225.

GOULA, A.M. **Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil—Kinetic modeling.** J. Food Eng. 2013, 117, 492–498.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. **Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004, 64, 763–781.

GUZMÁN-LORITE, M.; MARINA, M.L.; GARCÍA, M.C. **Pressurized liquids vs. high intensity focused ultrasounds for the extraction of proteins from a pomegranate seed waste.** Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 2022, 77, 102958.

HAGLER, A.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. **Yeasts from Marine and Estuarine Waters with Different Levels of Pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil.** Appl. Environ. Microbiol. 1981, 41, 173.

HEARD, G. M., & FLEET, G. H. **Candida Yarrowia (Candida) lipolytica.** Encyclopedia of Food Microbiology. (1999). 360–365.

HORWITZ, W.; GEORGE, W. Latimer Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2005.

HUANG, C.; CHEN, X.; XIONG, L.; CHEN, X.; MA, L.; CHEN, Y. **Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization.** Biotechnology Advances. 2013, 31(2), 129–139.

KANDYLIS, P., & KOKKINOMAGOULOS, E. **Food Applications and Potential Health Benefits of Pomegranate and its Derivatives.** Foods. (2020), 9(2), 122.

KUMAR, N.; GODARA, A.; MIRZA, A. **Characteristics of Flowering and Fruiting Description of Pomegranate (Punica granatum L.).** International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. (2020).

LANSKY, E.P.; NEWMAN, R.A. **Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer.** J. Ethnopharmacol. 2007, 109, 177–206.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. **Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations.** Bioresour. Technol. 2003, 87, 167–198.

LIU, H.H.; JI, X.J.; HUANG, H. **Biotechnological applications of Yarrowia lipolytica: Past, present and future.** Biotechnol. Adv. 2015, 33, 1522–1546.

LEPAGE, G.; ROY, C.C. **Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction.** J. Lipid Res. 1986, 27, 114–120.

LI, C.Y.; CHENG, C.Y.; CHEN, T.L. **Fed-batch production of lipase by Acinetobacter radioresistens using Tween 80 as the carbon source.** Biochem. Eng. J. 2004, 19, 25–31

LIU, H.-H.; JI, X.-J.; HUANG, H. **Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future.** *Biotechnology Advances*. 2015, 33(8), 1522–1546.

LANGLEY, P. **Why a pomegranate?** *BMJ*. 2000, 321(7269), 1153–1154.

LEVIN, G.M. **Pomegranate Roads: a Soviet Botanist's Exile from Eden.** (2006), pp 15-183

MAGANGANA T. P., MAKUNGA, N. P., FAWOLE, OA, OPARA, U.L. **Processing Factors Affecting the Phytochemical and Nutritional Properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Waste: A Review.** *Molecules*. 2020; 25(20):4690

MUKAMA, M., AMBAW, A., & OPARA, U. L. **Thermal properties of whole and tissue parts of pomegranate (*Punica granatum*) fruit.** *Journal of Food Measurement and Characterization*. (2018).

MUSSATO, S. I.; BALLESTEROS, L. F.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A. **Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes.** *Industrial Waste*. 2012.

NOVOTNÝ, C.; DOLEŽALOVÁ, L.; MUSIL, P.; NOVÁK, M. **The production of lipases by some *Candida* and *Yarrowia* yeasts.** *J. Basic Microbiol.* 1988, 28, 221–227.

NUNES, P.M.B.; FRAGA, J.L.; RATIER, R.B.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; BRÍGIDA, A.I.S.; FICKERS, P.; AMARAL, P.F.F. **Waste soybean frying oil for the production, extraction, and characterization of cell-wall-associated lipases from *Yarrowia lipolytica*.** *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2021, 44, 809–818.

OJEDA-HERNÁNDEZ, D.; COSÍO-CUADROS, R.; SANDOVAL, G.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, J.; MATEOS-DÍAZ, J. **Solid-State Fermentation as an Economic Production Method of Lipases.** *Methods in molecular biology*. 2018, 1835, 217-228.

PEREIRA, A.S.; FONTES-SANT'ANA, G.C.; AMARAL, P.F.F. **Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst.** *Food Bioprod. Process.* 2019, 115, 68–77.

PEREIRA, A.S.; DINIZ, M.M.; DE JONG, G.; GAMA FILHO, H.S.; DOS ANJOS, M.J.; FINOTELLI, P.V.; FONTES-SANT'ANA, G.C.; AMARAL, P.F.F. **Chitosan-alginate beads as encapsulating agents for *Yarrowia lipolytica* lipase: Morphological, physico-chemical and kinetic characteristics.** *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, 139, 621–630.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; SANTT' ANNA, G.L. **A stable lipase from *Candida lipolytica*: Cultivation conditions and crude enzyme characteristics.** *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1997, 63–65, 73–85.

ROJO-GUTIÉRREZ, E.; CARRASCO-MOLINAR, O.; TIRADO-GALLEGOS, J. M.; LEVARIO-GÓMEZ, A.; CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L.; BAEZA-JIMÉNEZ, R.; BUENROSTRO-FIGUEROA, J. J. **Evaluation of green extraction processes, lipid composition and antioxidant activity of pomegranate seed oil.** *Food Measure.* (2021), 15, 2098–2107.

SADH, P.K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. **Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review.** *Bioresour. Bioprocess.* 5, 1 (2018).

SAQIB, A.A.N.; HASSAN, M.; KHAN, N.F.; BAIG, S. **Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF).** *Process Biochem.* 2010, 45, 641–646.

SELVAKUMAR, P.; SIVASHANMUGAM, P. **Optimization of lipase production from organic solid waste by anaerobic digestion and its application in biodiesel production.** *Fuel 134 Processing Technology*, v. 165, 1-8, 2017.

SILVA, L.O.; RANQUINE, L.G.; MONTEIRO, M.; TORRES, A.G. **Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil enriched with conjugated linolenic acid (cLnA), phenolic compounds and tocopherols: Improved extraction of a specialty oil by supercritical CO₂.** *J. Supercrit. Fluids* 2019, 147, 126–137.

SOUZA, C. E. C.; FARIAS, M. A.; RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z. **Adding Value to Agro-industrial Co-products from Canola and Soybean Oil Extraction Through Lipase Production Using *Yarrowia lipolytica* in Solid-State Fermentation.** *Waste and Biomass Valorization*, 8(4), 1163–1176. 2016.

SOUSA, R.; PINTO, M.; AGUIEIRAS, E.; CIPOLATTI, E.; MANOEL, E.; SILVA, A.; PINTO, J.; FREIRE, D.; FERREIRA-LEITÃO, V. **Comparative performance and reusability studies of lipases on syntheses of octyl esters with an economic approach.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 45, 131-145. (2022).

TODESCHINI, J.K.P.; AGUIEIRAS, E.C.G.; DE CASTRO, A.M.; LANGONE, M.A.P.; FREIRE, D.M.G.; RODRIGUES, R.C. **Synthesis of butyl esters via ultrasound-assisted transesterification of macaúba (*Acrocomia aculeata*) acid oil using a biomass-derived fermented solid as biocatalyst.** *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2016, 133, S213–S219.

TODO BOM, M. A.; BOTTON, V.; ALTHEIA, F. M.; THOMAS, J. C.; PIOVAN, L.; CÓRDOVA, J.; KRIEGER, N. **Fermented solids that contain lipases produced by *Rhizopus microsporus* have an S-enantiopreference in the resolution of secondary alcohols.** *Biochemical Engineering Journal*, 107817. 2020.

TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V. **A review on microbial lipases production.** *Food Bioprocess Technol.* 2010, 3, 182–196.

VILADOMIU, M.; HONTECILLAS, R.; LU, P.; BASSAGANYA-RIERA, J. **Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents.** *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2013, 2013, 789764.

ZENEON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. (Eds.) **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos.** Instituto Adolfo Lutz: São Paulo, Brazil, 2008.