

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS
Campus de CAMPO GRANDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM – SBBq

JOHN DAYVAN MAIDANA SERPA

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE A PARTIR DO CONSUMO
DE GLICEROL INDUSTRIAL POR FUNGOS FILAMENTOSOS:
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MELHOR PRODUTOR

CAMPO GRANDE – MS

AGOSTO – 2018

JOHN DAYVAN MAIDANA SERPA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE A PARTIR DO CONSUMO
DE GLICEROL INDUSTRIAL POR FUNGOS FILAMENTOSOS:
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MELHOR PRODUTOR**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Giovana Cristina Giannesi

Coorientadora: Profa. Dra. Mariana da Silva Araujo

CAMPO GRANDE – MS

AGOSTO – 2018

TERMO DE APROVAÇÃO

JOHN DAYVAN MAIDANA SERPA

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE A PARTIR DO CONSUMO DE GLICEROL INDUSTRIAL POR FUNGOS FILAMENTOSOS: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MELHOR PRODUTOR

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

_____ de _____ de 2018

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Giovana Cristina Giannesi
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Profa. Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Estudar é, realmente, um trabalho difícil. Exige de quem o faz uma postura crítica, sistemática. Exige uma disciplina intelectual que não se ganha a não ser praticando-a.

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. Giovana Cristina Giannesi, pela dedicada orientação, apoio e amizade ao longo desses anos. Obrigado por tudo, principalmente o café!

Ao prof. Douglas Shodi Masui, pelo auxílio e orientações em experimentos, que sem dúvida me deixariam maluco.

Aos técnicos e professores do LBq, que de algum modo e em algum momento colaboraram no meu processo de aprendizagem e na realização deste trabalho.

Aos professores da graduação, que participaram da minha formação. Um agradecimento especial a profa. Dra. Fernanda Zandonadi Ramos pelo seu ensino mediador.

Aos alunos Amanda C. e Alex, pela colaboração indispensável nessa jornada.

A todos os colegas de laboratório, em especial Aline, Amanda O., Ângela, Arthur, Bruna, Dhébora, Camila, Isabela, Larissa, Luciana e Murilo. Obrigado pelos papos, conselhos, sugestões e risadas.

Aos meus amigos, pela compreensão e paciência quando eu não podia estar presente ou quando apenas dizia “preciso fazer um gel”. Obrigado pela torcida.

Aos meus pais, avó, irmãs e padrinho, pelo suporte que precisava para chegar até aqui. Amo vocês!

Ao Diogo, que acompanhando de perto ofereceu apoio necessário para começar e terminar essa jornada e pelo “empurrão” que precisava para viver a vida, de verdade. Obrigado.

Aos familiares, que presentes ou ausentes torceram por mim. Meus eternos agradecimentos.

Por fim, a Fundect pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E UNIDADES	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Fungos filamentosos	3
2.1.1. Gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Sarocladium</i>	3
2.2. Enzimas	4
2.2.1. Lipase.....	5
2.2.2. Aplicações biotecnológicas.....	8
2.2.3. Purificação	8
2.2.4. Imobilização de enzimas.....	9
2.3. Biodiesel.....	10
2.3.1. Glicerol	11
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo geral	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Microrganismos e manutenção	15
4.2. Produção das lipases em meio submerso	15
4.3. Determinação da atividade de lipase.....	15
4.4. Dosagem de proteína.....	16
4.5. Determinação da concentração de açúcares redutores e glicose no meio de cultura contendo glicerol industrial como fonte de carbono.....	17

4.6.	Consumo de glicerol industrial em diferentes concentrações pelos fungos <i>P. solitum</i> e <i>S. strictum</i>	17
4.7.	Consumo de glicerol usando a massa celular, extrato intra e extracelular de <i>S. strictum</i>	18
4.8.	Purificação da lipase extracelular de <i>S. strictum</i>	18
4.8.1.	Cromatografia em coluna de troca iônica	18
4.8.2.	Cromatografia em coluna de exclusão molecular	19
4.8.3.	Cromatografia em coluna de interação hidrofóbica	19
4.8.4.	Análise eletroforética em condição desnaturante (SDS-PAGE)	19
4.9.	Caracterização bioquímica parcial da lipase	20
4.9.1.	Efeito do pH e temperatura na atividade da enzima	20
4.9.2.	Efeito do pH na estabilidade enzimática	20
4.9.3.	Estabilidade da enzima na presença de surfactantes e detergentes	20
4.9.4.	Estabilidade da enzima na presença de solventes orgânicos	20
4.9.5.	Especificidade da enzima ao substrato	21
4.10.	Imobilização da lipase de <i>S. strictum</i>	21
4.10.1.	Efeito do reuso sobre a atividade da lipase imobilizada em alginato de cálcio	22
4.11.	Reprodução dos testes	22
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 1	23
5.1.	Seleção de fungos produtores de lipase em meio líquido	23
5.2.	Caracterização parcial das lipases extracelulares obtidas a partir dos fungos <i>P. solitum</i> e <i>S. strictum</i>	25
5.2.1.	Efeito do pH na atividade enzimática	25
5.2.2.	Efeito do pH na estabilidade enzimática	26
5.3.	Purificação da lipase extracelular de <i>S. strictum</i>	27
5.3.1.	Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	30
5.4.	Caracterização bioquímica parcial da lipase de <i>S. strictum</i> parcialmente purificada	31

5.4.1. Efeito do pH e temperatura na atividade da lipase parcialmente purificada.....	32
5.4.2. Estabilidade da lipase parcialmente purificada na presença de surfactantes e detergentes.....	33
5.4.3. Estabilidade da lipase parcialmente purificada na presença de solventes.....	34
5.4.4. Especificidade da lipase parcialmente purificada ao substrato	36
5.5. Imobilização da lipase de <i>S. strictum</i>	37
5.5.1. Aprisionamento em esferas de alginato de cálcio	38
5.5.1.1. Efeito do reuso sobre a atividade da lipase imobilizada em alginato de cálcio	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 2	40
6.1. Perfil de consumo de diferentes concentrações de glicerol industrial por <i>P. solitum</i> e <i>S. strictum</i>	40
6.2. Consumo de glicerol utilizando a massa celular, extrato intra e extracelular	41
6.3. Determinação da concentração de açúcar redutor no meio de cultura utilizando glicerol industrial como fonte de carbono.....	43
7. CONCLUSÃO	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de hidrólise de triacilglicerol realizada pela lipase (Lima, 2004).	6
Figura 2. Mecanismo de ativação interfacial das lipases (Barbosa <i>et al.</i> , 2015).....	7
Figura 3. Reação de hidrólise do substrato sintético <i>p</i> -NPP por lipase (Robert, 2015).....	16
Figura 4. Efeito do tempo de crescimento e de diferentes fontes de carbono na produção das lipases extracelulares.	24
Figura 5. Efeito do pH na atividade lipolítica dos fungos <i>S. strictum</i> e <i>P. solitum</i>	26
Figura 6. Efeito do pH na estabilidade enzimática.	27
Figura 7. Perfil cromatográfico de lipase de <i>S. strictum</i> em diferentes colunas de purificação.	29
Figura 8. Perfil eletroforético da lipase parcialmente purificada de <i>S. strictum</i> em condição desnaturante SDS-PAGE 9 %.	31
Figura 9. Efeito do pH na atividade lipolítica da enzima parcialmente purificada do fungo <i>S. strictum</i>	32
Figura 10. Efeito da temperatura na atividade lipolítica da enzima parcialmente purificada do fungo <i>S. strictum</i>	33
Figura 11. Efeito de solventes orgânicos na atividade da lipase parcialmente purificada de <i>S. strictum</i>	35
Figura 12. Atividade da lipase parcialmente purificada de <i>S. strictum</i> frente a diferentes substratos.	37
Figura 13. Ciclos de reuso da lipase de <i>S. strictum</i> imobilizada em alginato de cálcio.	39
Figura 14. Determinação de consumo de glicerol industrial em função do tempo de crescimento dos fungos.	41
Figura 15. Consumo de glicerol pela massa celular, extrato intra e extracelular do fungo <i>S. strictum</i>	42
Figura 16. Determinação da concentração de açúcares redutores no meio de cultura.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Purificação da lipase produzida por *S. strictum*. 28

Tabela 2. Efeito de surfactante e detergentes na atividade da lipase parcialmente purificada de *S. strictum*..... 34

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E UNIDADES

BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Sérica Bovina)
CAPS	<i>3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid</i> (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propano sulfônico)
CNBr	<i>Cyanogen bromide-activated</i> (brometo de cianogênio)
DEAE-celulose	<i>Diethylaminoethyl-cellulose</i> (dietilaminoetil-celulose)
DMSO	Dimetilsulfóxido
rDNA	<i>Ribosomal Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico ribossomal)
DNS	<i>3,5-Dinitrosalicylic acid</i> (ácido 3,5-dinitrosalicílico)
FPS1	FDP1 Suppressor
MANAE-agarose	Monoaminoetill- <i>N</i> -aminoetil
mmol/L	Milimol por litro
mol/L	Mol por litro
NaCl	Cloreto de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
<i>p</i> -NP	<i>p-nitrophenol</i> (<i>p</i> -nitrofenol)
<i>p</i> -NPA	<i>p-nitrophenyl acetate</i> (<i>p</i> -nitrofenil acetato)
<i>p</i> -NPM	<i>p-nitrophenyl myristate</i> (<i>p</i> -nitrofenil miristato)
<i>p</i> -NPO	<i>p-nitrophenyl octanoate</i> (<i>p</i> -nitrofenil octanoato)
<i>p</i> -NPP	<i>p-nitrophenyl palmitate</i> (<i>p</i> -nitrofenil palmitato)
q.s.p.	Quantidade suficiente para
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (dodecil sulfato de sódio)
STL1	Sugar Transporter-Like protein
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> (ácido tricloroacético)

Triton™ X-100	<i>4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol</i> (4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenoglicol)
TWEEN® 20	<i>Polyethylene glycol sorbitan monolaurate</i> (polietilenoglicol sorbitano de monolaurato)
TWEEN® 80	<i>Polyethylene glycol sorbitan monooleate</i> (polietilenoglicol sorbitano de monooleato)
Tyr	<i>Tyrosine</i> (tirosina)
U	Unidade enzimática
UCDB	Universidade Católica Dom Bosco

RESUMO

Lipases (EC 3.1.1.3) são acilhidrolases que catalisam a hidrólise e síntese de ésteres formados de glicerol e ácidos graxos e apresentam a capacidade de hidrolisar substratos hidrofóbicos em meio hidrofílico na interface lipídio-água. As lipases de aplicação industrial são preferencialmente obtidas de microrganismos como, *Penicillium*, *Acremonium* e *Aspergillus*, podendo ser empregadas em: processamento de óleos e gorduras, formulação de detergentes, síntese de fármacos e produção de biodiesel. Com relação à produção de biocombustíveis, o emprego de lipases de microrganismos substitui a hidrólise alcalina e facilita a recuperação do glicerol formado como subproduto. O glicerol pode ser usado nos setores alimentícios, cosmético, produção de papel, tecidos e tintas e, mais recentemente, vem sendo empregado no crescimento microbiano. O objetivo desse trabalho é avaliar a produção de lipase a partir do consumo de glicerol industrial por fungos filamentosos, purificar e caracterizar a enzima do melhor produtor. Na produção de lipase, *S. strictum* apresentou maior produção enzimática (3,13 U/mg) em glicerol industrial seguido de óleo de girassol (2,63 U/mg), enquanto *Penicillium solitum* teve a maior produção enzimática em azeite de oliva (0,48 U/mg), ambos em 168 h de crescimento em agitação constante (110 rpm). O pH ótimo das lipases de *S. strictum* e *P. solitum* foi 5,0, enquanto a lipase de *S. strictum* manteve-se estável por 120 min com 100 % de atividade, a de *P. solitum* foi estável pelo mesmo período em pH 7,0 e 8,0. A lipase de *S. strictum* foi purificada usando três colunas cromatográficas (DEAE-celulose, Sephacryl S-200 e Octyl-sepharose) com fator final de purificação de 24,4 vezes e rendimento de 16,1 %. A lipase purificada de *S. strictum* foi estável na presença de surfactante e detergentes (goma arábica, Triton™ X-100, TWEEN® 20 e TWEEN® 80); porém, mantendo entre zero e 4,72 % de atividade na presença de SDS. A lipase também foi estável na presença de metanol (80 %), DMSO e acetona (60 %); entretanto, apresentou atividade abaixo de 50 % nos demais solventes orgânicos (etanol, isopropanol, n-butanol e acetonitrila). A enzima exibiu atividade sobre *p*-NPP, *p*-NPM e *p*-NPO com atividade específica de 2,82, 4,09 e 8,71 U/mg, respectivamente. O teste de reuso da lipase imobilizada em alginato de sódio mostrou retenção de 70 % de atividade no segundo ciclo e 30 % no terceiro. As melhores concentrações de glicerol industrial usado como fonte de carbono foram: 0,5; 1; 2; 4 e 6 % para *P. solitum* e *S. strictum*. O uso do glicerol industrial como fonte de carbono para a produção de lipase pelo *S. strictum* mostrou-se uma alternativa viável, econômica e eco-amigável. Além disso, revelou a possibilidade para novas

investigações em aplicações industriais, principalmente no setor de conversão do glicerol em produtos de valor econômico agregado.

Palavras-chave: biodiesel, lipase, purificação, *Sarocladium strictum*.

ABSTRACT

Lipases (EC 3.1.1.3) are acylhydrolases that catalyzes the hydrolysis and synthesis of esters formed by glycerol and fatty acids and has the ability to hydrolyse hydrophobic substrates in hydrophilic medium on the lipid-water interface. The lipases for industrial application are preferably obtained from microorganisms such as, *Penicillium*, *Acremonium* and *Aspergillus* and may be employed at: oil and fat processing, detergents formulation, drug synthesis and biodiesel production. Regarding to biofuels production, the employment of lipases from microorganisms replaces the alkaline hydrolyses and facilitates the recovery of glycerol formed as a by-product. The glycerol meets the needs of the food, cosmetic, paper, fabric and paint sector and, more recently, has been employed in microbial growth. The aim of this study was to purify evaluate the lipase production through consumption of industrial glycerol by filamentous fungi, to purify and characterize the enzyme of the best producer. In lipase production, *S. strictum* showed higher enzymatic production (3.13 U/mg) in industrial glycerol followed by sunflower oil (2.63 U/mg), while *Penicillium solitum* had the higher enzymatic production in olive oil (0.48 U/mg), both at 168 h of growth in constant agitation (110 rpm). The optimal lipase pH of *S. strictum* and *P. solitum* was 5.0, while *S. strictum* lipase remained stable for 120 min with 100 % of activity and that of *P. solitum* was stable for the same period at pH 7.0 and 8.0. The *S. strictum* lipase was purified using three chromatographic columns (DEAE-cellulose, Sephacryl S-200 and Octyl-sepharose) with a final purification factor of 24.4 fold and yield of 16.1 %. The purified *S. strictum* lipase was stable in the presence of surfactants and detergents (gum arabic, Triton™ X-100, TWEEN® 20 e TWEEN® 80); however, maintaining between zero and 4.72 % of activity in the presence of SDS. The lipase was also stable in the presence of methanol (80 %), DMSO and acetone (60 %); however, it showed activity below 50 % in other organic solvents (ethanol, isopropanol, n-butanol and acetonitrile). The enzyme exhibited activity on *p*-NPP, *p*-NPM e *p*-NPO with specific activity of 2.82, 4.09 and 8.71 U/mg, respectively. The reuse test of immobilized lipase in sodium alginate showed retention of 70 % of activity on the second cycle and 30 % on third. The best concentrations of industrial glycerol used as carbon source were: 0.5; 1; 2; 4 and 6 % for *P. solitum* and *S. strictum*. The use of industrial glycerol as carbon source to lipase production by *S. strictum* proved to be viable, economical and eco-friendly alternative. In addition, reveals the possibility to new investigations in industrial application, mainly in the sector of conversion of glycerol to products of economic value added.

Keywords: biodiesel, lipase, purification, *Sarocladium strictum*.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se estende por uma área de 8,5 milhões de km² e no que se refere à bioprospecção, dispõe de diversas zonas climáticas que resultam em uma enorme variação ecológica, oportunizando a busca e pesquisas com diversos microrganismos, enzimas e genes com potencial biotecnológico (Valencia e Chambergo, 2013).

Enzimas são substâncias biológicas obtidas de organismos vivos, que têm como principal importância, atuar como catalizadores biológicos, aumentando as taxas das reações químicas dentro e fora da célula, sem provocar mudanças no equilíbrio entre reagentes e produtos e, sem que, durante a reação, elas sejam alteradas ou consumidas (Gurung *et al.*, 2013; Mohamad *et al.*, 2015).

As enzimas mais empregadas em processos industriais atualmente são as proteases, amilases, celulasas e lipases (Bornscheuer, 2018; Rigoldi *et al.*, 2018). As lipases têm uma vasta aplicabilidade biotecnológica e são utilizadas muitas pesquisas científicas, podendo ser empregadas nos setores farmacêutico, bioenergético, químico e agroquímico (Khan *et al.*, 2017), também na indústria alimentícia, além de aditivos em detergentes (Rasmey *et al.*, 2016).

Partindo do que se conhece a respeito de produção e estabilidade de enzimas, pesquisadores buscam desenvolver tecnologias de obtenção usando substratos menos onerosos (Panda *et al.*, 2016). Assim, diversos materiais considerados resíduos ou rejeitos, são utilizados no crescimento microbiano e produção de enzimas como, por exemplo, farelo de trigo (Chandorkar *et al.*, 2014), farelo de soja, pinhão-manso (Osho *et al.*, 2014), águas residuais (D'annibale *et al.*, 2006), bagaço de cana (Kumar e Kesavapillai, 2012), casca de centeio (Ghosh e Ghosh, 2018), sabugo de milho, serragem de eucalipto, casca de laranja, palha de arroz e palha de milho (Facchini *et al.*, 2011).

A indústria de enzimas tem crescido rapidamente, principalmente nas últimas quatro décadas, na qual os fungos tiveram grande importância biotecnológica e econômica. As enzimas fúngicas têm sido produzidas em grandes quantidades por preços reduzidos e, ainda, podem ter suas propriedades modificadas de acordo com a necessidade do setor industrial (Souza *et al.*, 2017a). O mercado global de enzimas movimentam bilhões de dólares anualmente e o grande número de patentes e artigos científicos existentes reflete este mercado (Silva, 2017).

A diversidade de habitats onde os microrganismos com potencial para produção de lipases são encontrados inclui: resíduos industriais, fábrica de processamento de óleo vegetal, laticínios, solos contaminados com óleos e em sementes oleaginosas. Fungos reconhecidos como bons produtores de lipases pertencem aos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizomucor* e *Acremonium* (Treichel *et al.*, 2010; Sreelatha *et al.*, 2017).

A expressão das lipases é fortemente induzida pela fonte de carbono usada no meio de cultura e normalmente são produzidas por microrganismos quando crescidos na presença de algum tipo de lipídio (Treichel *et al.*, 2010). No entanto, alguns gêneros como *Aspergillus* (Chandorkar *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2017) e *Fusarium* (Ângelo *et al.*, 2014) a produzem de modo constitutivo, incluindo quando crescidos em glicerol (Haas e Bailey, 1993; Volpato *et al.*, 2008; Robert *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2017).

As lipases são as enzimas com maior prospecção para a produção de biodiesel, podendo substituir a hidrólise alcalina, reduzindo custos melhorando rendimento e produtividade (Maldonado *et al.*, 2016). O biodiesel é produzido pela reação de transesterificação ou alcólise de óleos vegetais ou gordura animal com metanol ou etanol, gerando aproximadamente 10 % (m/m) de glicerol como subproduto (Loaces *et al.*, 2016).

Glicerol é um poliol constituinte dos triacilgliceróis, que é livre de cor, cheiro e toxicidade, apresentando alta viscosidade e gosto adocicado. Esse composto ganhou espaço nos setores alimentício, farmacêutico, cosmético, higiene, tinta, papel, têxtil, couro e explosivos (Semkiv *et al.*, 2017). Como resultado da indústria do biodiesel, no glicerol cru encontram-se impurezas que necessitam de vários passos para sua eliminação, obtendo-se um produto purificado, porém com preço elevado (Uprety *et al.*, 2017). Diante desse cenário, esforços são direcionados para a identificação de novas possibilidades de valorização do glicerol em condição não tratada (Tudorache *et al.*, 2017).

Assim, o objetivo nesse trabalho foi avaliar a produção de lipase a partir do consumo de glicerol industrial por fungos filamentosos, purificação e caracterizar a enzima do melhor produtor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fungos filamentosos

Fungos são organismos eucarióticos com ampla versatilidade metabólica para produzir e secretar altas concentrações de proteínas e metabólitos e, por essa razão, estão continuamente recebendo destaque em muitos estudos (Barrios-González e Tarragó-Castellanos, 2017). São organismos particularmente interessantes por conta do cultivo facilitado, que permite a obtenção de enzimas extracelulares liberadas no meio de cultura (Guimarães *et al.*, 2006).

Os metabólitos secundários produzidos principalmente por actinomicetos e fungos apresentam estruturas químicas sofisticadas, normalmente produzidas na fase tardia do crescimento microbiano. Muitos dos metabólitos têm potencial para uso industrial, alcançando uma ampla faixa de atividades biológicas (Barrios-González e Tarragó-Castellanos, 2017) e estima-se que 50 % dos produtos farmacêuticos e biotecnológicos existentes, provêm dos processos de fermentação com fungos filamentosos (González-Bermúdez *et al.*, 2017).

2.1.1. Gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Sarocladium*

Um dos propósitos da biotecnologia é produzir produtos de valor econômico por meio da catálise biológica, a partir de células vivas. Alguns gêneros de fungos com importância para o setor industrial são aqueles pertencentes ao filo *Ascomycota* como, *Aspergillus* e *Penicillium*, aos quais é atribuído o emprego em diversos processos alimentícios fermentativos (Nielsen, 2018). São organismos com extensa capacidade degradativa sendo, portanto, grandes produtores de enzimas (Tsang *et al.*, 2018).

Considerado versátil e oportunista, parte dos fungos do gênero *Penicillium* é saprofítico e responsável pela deterioração de frutas e verduras no período pós-colheita (Li e Zong, 2010). Além disso, se destacam pela produção de metabólitos secundários ativos, incluindo pigmentos com atividade antimicrobiana (Geweely, 2011), produção de enzimas lignocelulolíticas (Liu *et al.*, 2013), além de estarem envolvidos nos processos de produção no setor alimentício de carne fermentada e queijos (Nout e Aidoo, 2002; Asefa *et al.*, 2009).

Fungos que fazem parte do gênero *Aspergillus* têm sido utilizados na produção de alimentos e cervejas por mais de 1500 anos (Contesini *et al.*, 2017). Outras aplicações

incluem a clarificação de sucos (Oliveira *et al.*, 2018), alimentação animal (Facchini *et al.*, 2011) e produção de etanol (Rocha *et al.*, 2013).

Outros grupos pertencentes ao filo *Ascomycota* são *Acremonium* e *Sarocladium*. O gênero *Acremonium* é um grande e complexo grupo polifilético, que compreende diversas espécies pertencentes a várias ordens da classe *Sordariomycetes*. Após análises filogenéticas baseadas em sequências de rDNA, este gênero passou por uma forte revisão e teve algumas espécies transferidas para o gênero *Sarocladium* por Summerbell *et al.* (2011), as quais foram posteriormente confirmadas filogeneticamente por Giraldo *et al.* (2015).

Atualmente, dez espécies fazem parte do gênero *Sarocladium*, algumas delas grandes patógenos de plantas como *S. oryzae* ou, de outros fungos, como *S. mycophilum*, um micoparasita encontrado em *Cortinarius subserpentes* (Giraldo *et al.*, 2015). O fungo *Acremonium strictum* foi outra espécie transferida para o gênero *Sarocladium*, que de acordo com Giraldo *et al.* (2015) é um fungo endofítico de milho com importância clínica.

2.2. Enzimas

O interesse na utilização de enzimas em processos biotecnológicos provém das diferentes propriedades bioquímicas que apresentam. A alta especificidade a determinados substratos somada ao planejamento e seleção de enzimas específicas, as tornam uma alternativa amigável para o ecossistema, pois nessas condições sua aplicação aumenta a produtividade, reduz custos com energia e diminui a produção de resíduos e compostos pouco interessantes (Maldonado *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2017b).

Em 2004, segundo a *Business Communications Company, Inc.*, o mercado global de enzimas movimentou aproximadamente 2 bilhões e o volume de enzimas industriais vem aumentando, acompanhado da redução dos preços (Hasan *et al.*, 2006). Dentre as numerosas enzimas produzidas e extensivamente estudadas, podemos citar as amilases (Pandi *et al.*, 2016), xilanases (Watanabe *et al.*, 2014), proteases (Salihi *et al.*, 2017) e lipases (Sahoo *et al.*, 2016), entretanto, nas últimas duas décadas as lipases avançaram em certo grau, sobretudo na área de síntese orgânica (Savitha *et al.*, 2007; Gricajeva *et al.*, 2018).

Nos estudos com lipases, trabalhos utilizando fungos mesofílicos vêm aumentando, uma vez que enzimas provenientes desses organismos podem apresentar estabilidade a altas temperaturas. No entanto, os organismos termofílicos demonstraram ser mais úteis para aplicações biotecnológicas por possuírem elevada estabilidade. Portanto, compreender os

detalhes com relação à estrutura e função das lipases, permitirá aos pesquisadores investigar novas possibilidades biotecnológicas (Hasan *et al.*, 2006).

Muitas lipases produzidas por fungos filamentosos foram alvos de estudos nos últimos anos. Dentre os organismos estudados estão o gênero *Aspergillus* (Ilmi *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2017), *Penicillium* (Mohammed *et al.*, 2013; Turati *et al.*, 2017) e *Acremonium* (Pereira *et al.*, 2013).

2.2.1. Lipase

O uso da tecnologia enzimática é uma ferramenta promissora para a síntese de compostos de alto valor e dentre as enzimas com maior potencial estão as lipases, que apresentam a capacidade de catalisar reações em meios com condições restritas de água (Treichel *et al.*, 2016). Uma vez que parte da biomassa existente no planeta é formada por gorduras, as lipases tornam-se relevantes no sentido de promover a ciclagem desses materiais (Edupuganti *et al.*, 2017), podendo ainda serem utilizadas na purificação de águas residuais e no tratamento de rejeitos, especialmente os sólidos (Pereira *et al.*, 2016).

Podem ser obtidas de animais e vegetais, no entanto, por apresentarem elevada produção, apenas os microrganismos são comercialmente significantes (Maldonado *et al.*, 2016), ficando a cargo dos fungos certo destaque no aumento da sua produção (Mehta *et al.*, 2017). Ambientes contendo resíduos oleosos como, esgoto, depósitos de lixo e efluentes de fábrica, promovem um bom habitat para o crescimento de microrganismos e produção destas enzimas (Trevisan, 2004; Hasan *et al.*, 2006).

De todo o montante de lipase comercializada, aproximadamente 50 % é obtido de fungos filamentosos e leveduras (Maldonado *et al.*, 2016), dos quais vários gêneros são frequentemente citados e estudados como fontes produtoras, tais como *Rhizopus* sp. (Kharrat *et al.*, 2011), *Aspergillus* sp. (Costa, 1996; Saxena *et al.*, 2003), *Fusarium* sp. (Rifaat *et al.*, 2010), *Penicillium* sp. (Pinheiro, 2006), *Candida* (Maldonado *et al.*, 2016), entre outras. Fungos do gênero *Penicillium* são bons produtores de lipases extracelulares (Li e Zong, 2010), enquanto *Aspergillus* produz lipases com grande potencial e propriedades bioquímicas diversificadas como termoestabilidade, estabilidade a uma ampla faixa de pH, estabilidade a solventes e especificidade ao substratos (Contesini *et al.*, 2010).

As lipases microbianas normalmente apresentam alta estabilidade (Facchini *et al.*, 2015; Li e Liu, 2017), além disso, devido ao baixo custo de produção, lipases termoestáveis

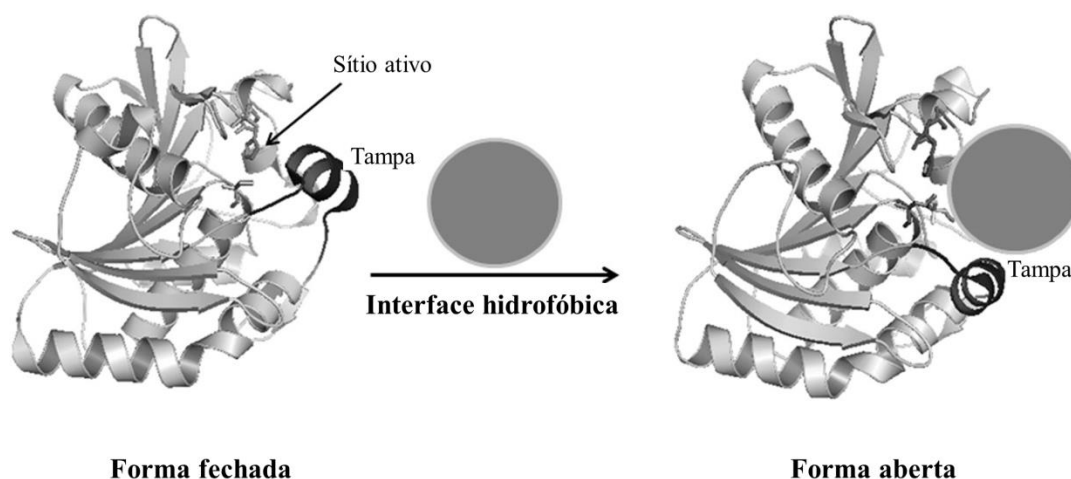


Figura 2. Mecanismo de ativação interfacial das lipases (Barbosa *et al.*, 2015).

Propriedades bioquímicas das lipases relacionadas à atividade enzimática e especificidade ao substrato, facilitam seu emprego em processos industriais (Facchini *et al.*, 2015). Dependendo da quantidade de água presente no meio de reação, essas enzimas realizam esterificação, interesterificação, transesterificação, alólise e acidólise, aminólises (síntese de amidas), além de acilação e resolução de misturas racêmicas (Colla *et al.*, 2010; Salihu e Alam, 2015).

Baseadas no valor de mercado, as lipases são consideradas o terceiro maior grupo de enzimas (Pereira *et al.*, 2015). Dos 4,8 bilhões de dólares que a indústria de enzimas movimentou em 2013, as lipases corresponderam a 5 % desse montante (Robert *et al.*, 2016) e projeta-se uma estimativa de que o mercado das lipases alcance os 590,5 milhões até 2020. A estimativa para o mercado global de enzimas é de 7,1 bilhões em 2018 (Kavitha, 2016).

Embora apresentem excelente atuação catalítica, a dificuldade na separação e recuperação das lipases na condição livre, limita seu uso em processos industriais em larga escala. Desse modo, realizar a imobilização dessas enzimas pode ser um excelente método para superar tais problemáticas (Souza *et al.*, 2017b). Em alguns casos, aumentar a estabilidade e atividade algumas vezes exige que as lipases sejam imobilizadas, acarretando em maior rentabilidade (Ferreira *et al.*, 2018) por meio da redução de novas aquisições, já que são anunciadas no mercado por valores significativos (Quilles *et al.*, 2014).

Desse modo, dentre as metodologias empregadas para imobilização de lipases, encontra-se o encapsulamento (Won *et al.*, 2005; Jegannathan *et al.*, 2009), adsorção (Kharrat

et al., 2011; Imanparast *et al.*, 2018), ligação covalente (Lima *et al.*, 2013) e reticulação (Khanahmadi *et al.*, 2015).

2.2.2. Aplicações biotecnológicas

As enzimas lipolíticas apresentam grande potencialidade de uso em diversos setores de bioprocessos e são empregadas na indústria alimentícia, têxtil, medicinal, de papel, de couro (Pereira *et al.*, 2015; Mehta *et al.*, 2017), no processamento de óleos e gorduras, formulação de desengraxantes, síntese de produtos para a química fina e fármacos, além da produção de cosméticos e tratamento de efluentes e rejeitos (Liu *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2009). Do mesmo modo, apresentam alta estabilidade e atividade em meios alcalinos, contribuindo na produção de sabões e detergentes (Maldonado *et al.*, 2016).

Outra relevante aplicação das lipase de acordo com o trabalho realizado por Souza *et al.* (2017b), é no processo de obtenção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) por meio da hidrólise de óleo de peixe, o qual é rico em ácidos *cis*-5,8,11,15 e 17-eicosapentaenóico (EPA) e ácido *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (DHA).

Lipases de várias espécies de fungos têm sido purificadas e caracterizadas, como de *Aspergillus carneus* (Saxena *et al.*, 2003), *Aspergillus japonicas* (Bharti *et al.*, 2013), *Aspergillus oryzae* (Toida *et al.*, 1995), *Penicillium candidum* (Ruiz *et al.*, 2001), *Aspergillus niger* (Mhetras *et al.*, 2009), *Aspergillus terreus* (Sethi *et al.*, 2016), dentre outros.

2.2.3. Purificação

Em sua maioria, o emprego da biocatálise não requer a enzima purificada, porém, de acordo com a aplicação industrial final, como em química fina, fármacos e cosméticos, um determinado grau de pureza é exigido (Singh e Mukhopadhyay, 2012). Diversas lipases microbianas são extensivamente estudadas e purificadas ao longo dos anos. As técnicas de purificação frequentemente empregadas envolvem ultrafiltração (Bernal *et al.*, 2017), precipitação por sulfato de amônio (Ruiz *et al.*, 2001), ou acetona (Edupuganti *et al.*, 2017), ou etanol (Veeraragavan *et al.*, 1990), técnicas cromatográficas em resinas hidrofóbicas (Facchini *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018), exclusão molecular (Sethi *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018), dentre outras.

Entretanto, por conta da grande quantidade de aminoácidos hidrofóbicos na superfície das lipases (Salameh e Wiegel, 2010), existe uma forte propensão à formação de agregados, tornando o processo de purificação dessas enzimas imprevisível (Hemamalini e

Khare, 2016). Alguns compostos como, isopropanol (Graupner *et al.*, 1999), SDS (Salameh e Wiegel, 2010) e colato de sódio (Rúa *et al.*, 1997) são usados no processo de desagregação.

Essa propensão das proteínas a formar agregados é muito comum durante os processos de purificação, tornando-se um fator limitante para sua aplicação, além de levar a perda de proteínas presentes na suspensão. Isso normalmente ocorre devido às interações intermoleculares entre regiões desordenadas presentes na superfície das proteínas, em que a dinâmica das interações varia de acordo com a estrutura dessas regiões – comprimento, aminoácidos que a compõe e a sua interação com o restante da estrutura proteica (Kamal *et al.*, 2015).

2.2.4. Imobilização de enzimas

A imobilização de uma enzima consiste no confinamento dessa molécula em certa região definida de uma matriz (suporte); porém, mantendo a maior parte de sua atividade catalítica inicial preservada (Hakimzadeh e Sadeghi, 2017). É uma metodologia que pode aprimorar propriedades como, recuperação, estabilidade, seletividade e menor inibição, além disso, diversos suportes e métodos de imobilização são testados a fim de preservar a atividade catalítica (Urrutia *et al.*, 2018).

A imobilização de enzimas é um dos métodos mais realizados para se obter os padrões ótimos de um catalisador biológico. Dentre as vantagens obtidas têm-se a possibilidade de uso contínuo e repetitivo, além da facilidade na separação dos produtos e substratos não reagidos, evitando a contaminação do produto final com as proteínas utilizadas (Won *et al.*, 2005). Enzimas podem ser imobilizadas por métodos como: aprisionamento ou encapsulamento em membrana polimérica, adsorção física em materiais hidrofóbicos e resinas de troca iônica, ligação covalente em matriz insolúvel e reticulação (Souza *et al.*, 2017c).

De acordo com Fernández-Fernández *et al.* (2013), o aprisionamento consiste na retenção física da enzima em uma matriz sólida porosa (poliacrilamida, colágeno, alginato ou gelatina). Nesse tipo de imobilização, a enzima é confinada a um determinado espaço por meio de processos como a geleificação, no qual um polímero com característica iônica é submetido a um contra-íon multivalente (Won *et al.*, 2005).

O ácido algínico (alginato), um biopolímero extraído de algas marrons (Gombotz e Wee, 1998) é frequentemente usado nessa técnica graças a sua propriedade de geleificação branda e atóxica (Won *et al.*, 2005). O alginato tem sido empregado na imobilização de

enzimas utilizadas em diversos estudos. Zhang *et al.* (2013) utilizaram lipase imobilizada em esferas de alginato para avaliação enzimática na hidrólise de *p*-nitrofenol butirato. Já Oliveira *et al.* (2018) imobilizaram pectinase de *Aspergillus aculeatus* para aplicação no clareamento de sucos.

A adsorção física é um método reversível, que consiste em promover a interação entre a enzima e o suporte por forças fracas como, Van der Waals, interação hidrofóbica, ligações de hidrogênio e no caso de resinas iônicas, por ligação iônica. Essas ligações reversíveis permitem realizar a dessorção das enzimas em casos de queda de atividade, podendo o suporte ser regenerado e preparado para uma nova imobilização (Mohamad *et al.*, 2015). Devido a algumas particularidades, mais especificamente o mecanismo de ativação interfacial, as lipases parecem interagir fortemente com interfaces hidrofóbicas, em que se aproveita desse mecanismo para imobilização em suportes com essa propriedade (Bastida *et al.*, 1997).

Outras pesquisas usando diversos suportes têm sido realizadas. Tavano *et al.* (2013) imobilizaram amilase de batata doce em glutaraldeído-agarose (hidrofóbico), enquanto, Imanparast *et al.* (2018) imobilizaram lipase de *Actinomadura sediminis* em celite e, Zheng *et al.* (2012) utilizaram partículas de sílica na imobilização de lipase de *Candida rugosa* comercial, usada na síntese biocatalítica de ésteres de fitosteróis.

Na imobilização covalente promove-se a interação entre a enzima e o suporte por meio de ligação covalente. Normalmente, vários resíduos estão envolvidos nessa interação, impedindo que agentes e condições desnaturantes como, solventes orgânicos, pH e temperaturas elevadas possam agredir a integridade da enzima (Souza *et al.*, 2017c). Em muitos casos, a manutenção da integridade é alcançada por meio da ligação multipontual da enzima ao suporte, proporcionando rigidez e aumento da estabilidade; no entanto, ligações covalentes multipontuais podem ser moderadas, acarretando em instabilidade nas ligações (Mateo *et al.*, 2007).

2.3. Biodiesel

Devido ao atual consumo de combustíveis fósseis, acredita-se que as fontes de matéria prima se tornarão cada vez mais escassas nos próximos anos e, concomitantemente, os preços de produção aumentem (Hasan *et al.*, 2006). A fim de reduzir os impactos causados pelo uso desses recursos, pesquisadores vertem esforços na busca por compostos energéticos produzidos a partir de materiais renováveis (Pradima *et al.*, 2017).

Um dos recursos energéticos alternativos com possibilidade de substituir os derivados fósseis é o biocombustível, pois pode ser obtido a partir de materiais renováveis, além de gerar menor impacto ambiental e apresentar boa combustibilidade (Wang *et al.*, 2017). Neste cenário, o biodiesel se destaca, tornando-se a proposta mais conveniente para a substituição do diesel comum, uma vez que esse tipo de combustível, além de não produzir óxidos de enxofre, libera quantidades de partículas de fuligem três vezes menor quando comparado ao combustível derivado do petróleo (Hasan *et al.*, 2006).

O biodiesel pode ser definido como longas cadeias de acil éster de ácidos graxos (Garlapati *et al.*, 2016; Hidalgo e Puerta-Fernández, 2017) formadas a partir da reação de transesterificação entre um óleo vegetal ou animal na presença de um álcool (metanol ou etanol), juntamente com um catalisador básico, rendendo além do próprio biodiesel, o glicerol como subproduto (Ugur *et al.*, 2014). Segundo Bansal *et al.* (2008), a fim de manter a qualidade ótima do biodiesel produzido, padrões relacionados aos triacilgliceróis não reagidos e ao glicerol produzido devem ser considerados, pois interferem na pureza do produto.

O Brasil, juntamente com países como Estados Unidos, Alemanha, França e Holanda, lideram o ranking de produção de biodiesel no mundo (Pradima *et al.*, 2017). Segundo o relatório da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, a produção nacional alcançou 3,94 bilhões de litros em 2015 (Brasil, 2016).

Avaliou-se que até 2016 a produção do biodiesel aumentou 42 %, alcançando 37 bilhões de galões, produzindo indiretamente 4 bilhões de galões de glicerol e que em 2020 o mercado global para o biodiesel atingirá a margem de US\$ 2.52 bilhões (He *et al.*, 2017).

Nesse contexto, em termos de produção em larga escala, a valorização do glicerol tornou-se uma importante prioridade para a ciência (Papanikolaou *et al.*, 2017), o que estimulou estudos para a bioconversão do glicerol em produtos de valor econômico (Upreti *et al.*, 2017; Vivek *et al.*, 2017).

2.3.1. Glicerol

Devido ao volume de produção, o glicerol quando recuperado passa a ser considerado um resíduo e embora possa ser aplicado em diversos setores, a necessidade de purificação o torna economicamente inviável (Pradima *et al.*, 2017). Desse modo, a bioconversão do glicerol em produtos de valor agregado mostra-se uma opção promissora de uso sustentável e eco amigável (Wang *et al.*, 2017).

O glicerol é um composto orgânico que pode ser encontrado em toda a natureza, do qual a maior parte é provavelmente de origem biótica, uma vez que forma a estrutura central dos lipídios de membrana (fosfolipídios) e de armazenamento (triacilgliceróis). Por conta dessa grande disponibilidade, os organismos de algum modo desenvolveram maneiras de utilizá-lo como fonte de carbono e energia (Klein *et al.*, 2017).

O glicerol (propano-1,2,3-triol) é um álcool trivalente resultante da degradação dos glicerídeos (Patil *et al.*, 2017) e representa 10 % (m/m) do total do biocombustível formado ao final do processo de produção (Christopher *et al.*, 2014). Desse modo, quando recuperado, por conter impurezas como, metanol, éster metílico de ácidos graxos e sal, que somado à necessidade do refinamento a custos elevados, passa a ser considerado um resíduo de baixo valor comercial, tornando seu uso inviável nas indústrias tradicionais (He *et al.*, 2017).

De acordo com as condições da reação, a composição do resíduo cru resultante do processo de produção do biodiesel é variável, em que se encontram porcentagens de glicerol variando de menos de 45 a 90 %. Por isso, torna-se difícil apontar suas reais propriedades, sem considerar a drástica concentração de mono-di-triacilgliceróis, sais de reação e água encontrada na mistura crua após a separação do biodiesel (He *et al.*, 2017).

Apesar de o glicerol acumulado ser considerado um rejeito das indústrias de biodiesel, bioetanol e oleoquímica (Klein *et al.*, 2016), o seu grau de redução quando comparado com moléculas como a glicose e xilose, o torna um recurso promissor no uso como insumo para a produção microbiana de diversos produtos de valor agregado (Islam, 2016).

Na tecnologia de bioconversão, que utiliza microrganismos crescidos em glicerol para o metabolismo fermentativo (Yazdani e Gonzalez, 2007), há a produção de ácido propiônico por bactérias do gênero *Propionibacterium* (Himmi *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2011), ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* (Rywińska *et al.*, 2010), síntese de lipídeos por *Candida freyschussii* (Raimondi *et al.*, 2014), alimentação animal (Mach *et al.*, 2009) e produção de aditivos para biocombustível (Khayoon e Hameed, 2011).

Com possibilidade de uso em diversas áreas bioindustriais, o glicerol atende os setores farmacêutico, alimentício, cosmético, higiene pessoal, papel, couro, tecido e tintas (Christopher *et al.*, 2014; Garlapati *et al.*, 2016). Outros caminhos alternativos para a utilização comercial do glicerol referem-se à conversão em produtos como, 1,3-propanediol (Chatzifragkou *et al.*, 2011), composto base para a produção de poliéster e poliuretano

(Szymanowska-Powalowska, 2014) ou também no uso energético, mais precisamente em meios de cultura para fermentação de microrganismos, uma vez que as características químicas do glicerol promovem maior rendimento em relação aos açúcares para a produção de compostos reduzidos, como álcool e hidrogênio (Hidalgo e Puerta-Fernández, 2017).

Em termos de fonte energética para microrganismos, de acordo com Klein *et al.* (2016), a partir de estudos realizados com *S. cerevisiae* revelaram que a captação do glicerol é realizada por meio de um sistema simporte-glicerol/H⁺ codificado pelo gene STL1 e que esse mesmo organismo expressa um facilitador de glicerol codificado como FPS1.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a produção de lipase a partir do consumo de glicerol industrial por fungos filamentosos.

3.2. Objetivos específicos

- I. Avaliar a produção de lipase a partir de cinco fungos filamentosos [*Penicillium solitum*, *Penicillium* sp.1, *Sarocladium strictum* 7546 (sinonímia: *A. strictum*), *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.2] realizada em condição submersa usando glicerol industrial e outras fontes de carbono;
- II. Selecionar o melhor produtor de lipase para caracterização bioquímica parcial: pH, temperatura e estabilidade.
- III. Purificar a lipase extracelular do melhor fungo produtor;
- IV. Imobilizar a lipase purificada em diferentes suportes;
- V. Avaliar o consumo de glicerol industrial usado como fonte de carbono.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismos e manutenção

Os cinco fungos utilizados nesse trabalho [*Penicillium solitum*, *Penicillium* sp.1, *Sarocladium strictum* 7546 (sinonímia: *A. strictum*), *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.2] foram isolados pela Me. Clarice Rossatto Marchetti e identificados em parceria com a Dra. Cristina de Souza Motta da Universidade Federal de Pernambuco. Para a manutenção dos microrganismos foram feitos repiques em tubo inclinado contendo meio de cultura com a seguinte composição (g/L): 200 g de batata, 15 g de ágar e 2 % de glicerol industrial (cedido por Ruy Caldas da UCDB), seguido de incubação em estufa a 30 °C por um período de 7 a 10 dias. Posteriormente, os fungos foram armazenados em geladeira até o momento de uso (por um período de até 30 dias).

4.2. Produção das lipases em meio submerso

Os fungos foram crescidos em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio SR (Rizzatti *et al.*, 2001) pH 6,5, constituído de: Solução de sais [$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1 %); KH_2PO_4 (0,3 %); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,24 %) (20 x)] (5,0 mL); Extrato de levedura (0,45 %); Peptona (0,02 %); H_2O q.s.p. 100 mL e 1 % (v/v ou p/v) de óleo de girassol (LIZA[®]), ou óleo de oliva (LA VALENCIANA[®]), ou glicose ou glicerol industrial como fonte de carbono, sob agitação (110 rpm) a 30 °C por um período de até 168 h. Após esse período, os meios de cultura foram filtrados com papel filtro Whatman n° 1. Os filtrados contendo a enzima extracelular foram utilizados em estudos posteriores.

4.3. Determinação da atividade de lipase

Para avaliação da atividade lipolítica foi seguido o método de Pereira (2011) modificado, no qual foi utilizado como substrato o composto sintético *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP, do Inglês *p-nitrophenyl pamitate*), em que a hidrólise foi determinada descontinuamente a 50 °C pela liberação do *p*-nitrofenol (Figura 3) acompanhada por leituras em leitor de microplacas (marca: MOLECULAR DEVICES, modelo: SPECTRAMAX PLUS 384) em 410 nm. A solução de reação para a determinação da atividade lipolítica consistiu de duas soluções misturadas 10 min antes do início dos testes para ideal homogeneização na proporção de 9:1 (v/v) – Solução I: Goma arábica (0,05 g); Tampão citrato-fosfato pH 6,0 (90 mL) (McIlvaine, 1921); Triton[™] X-100 (250 μL); e Solução II: *p*-NPP (0,03 g); Isopropanol (10 mL). A solução I foi homogeneizada por 25 min e estocada a 4 °C; A solução II,

homogeneizada por 5 min e estocada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em todos os testes realizados a solução de reação residual foi descartada. O meio de reação padrão consistiu de $50\text{ }\mu\text{L}$ do extrato bruto contendo a enzima e $450\text{ }\mu\text{L}$ de solução de reação (solução I + II, conforme descrito anteriormente), incubados a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min, seguido de aquecimento em banho fervente pelo mesmo período para total inativação da enzima. À mistura de reação foram adicionados $500\text{ }\mu\text{L}$ de solução saturada de tetraborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ – pH 8,0 – 9,0) e a leitura de absorbância realizada em leitora de microplacas em 410 nm. Solução em branco contendo a enzima previamente desnaturada por aquecimento em banho fervente por 5 min em $450\text{ }\mu\text{L}$ de solução de reação foi incluída em cada experimento. A mistura de reação e o branco foram aquecidas nas mesmas condições de temperatura e tempo, seguido da adição de $500\text{ }\mu\text{L}$ de solução saturada de tetraborato de sódio, determinando-se assim a hidrólise espontânea dos substratos nas condições do ensaio. A unidade enzimática (U) de lipase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar um micromol de *p*-nitrofenol por minuto ($\mu\text{mol}/\text{min}$) nas condições de ensaio descritas acima.

Os resultados foram expressos em unidade por mililitro (U/mL) ou unidade por miligrama (U/mg) de proteína. O valor de atividade específica (U/mg) foi obtido pela razão entre a atividade enzimática (U/mL) e o valor da massa de proteínas (mg/mL).

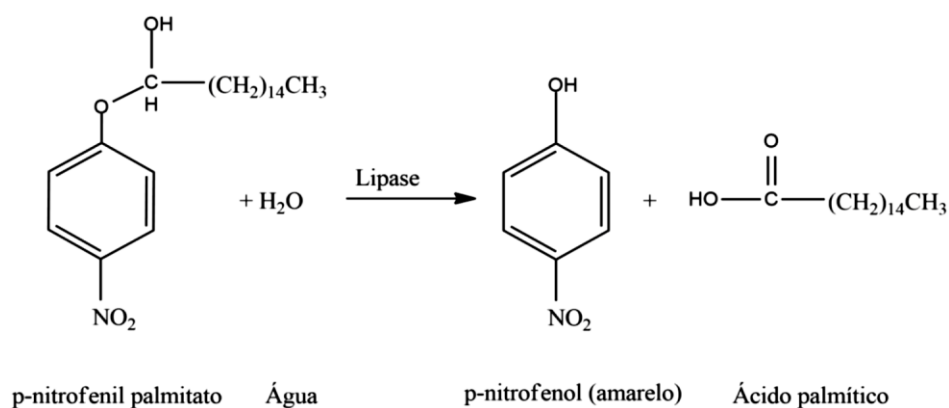


Figura 3. Reação de hidrólise do substrato sintético *p*-NPP por lipase (Robert, 2015).

4.4. Dosagem de proteína

A dosagem de proteína foi realizada segundo o método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA, do Inglês *Bovine Serum Albumin*) como padrão. Em amostras proteicas contendo Triton™ X-100, a fim de evitar interferência ocasionada por

esse detergente foi utilizado 100 μ L de uma solução de SDS a 20 % em cada tubo a ser avaliado, conforme Wang e Smith (1975) modificado. A quantidade de proteína foi expressa em miligrama por mililitro (mg/mL).

4.5. Determinação da concentração de açúcares redutores e glicose no meio de cultura contendo glicerol industrial como fonte de carbono

Os fungos *P. solitum* e *S. strictum* foram crescidos em meio SR (conforme item 4.2) com 1 % de glicerol industrial. Objetivando-se verificar se os fungos em estudo estariam usando o glicerol como fonte de carbono, ou convertendo-o em açúcares redutores como glicose, alíquotas foram retiradas a cada 24 h de crescimento e misturadas com DNS, segundo metodologia de Miller (1959) para quantificação de açúcares redutores presentes no meio de cultura. O branco foi feito com a substituição do extrato bruto por água destilada e submetida às mesmas condições de ensaio. Como controle, foram utilizadas amostras do meio de cultura não inoculado.

Para a quantificação de glicose no meio de cultura foi utilizado o kit de glicose-oxidase (Labtest ref. 133) e 10 μ L da amostra concentrada a partir de 1 mL. As leituras de absorbância foram realizadas em leitora de microplacas em 540 nm para açúcares redutores e 505 nm para quantificação de glicose. Como padrão, foi usada solução de glicose 1 mg/mL. Como controle foi utilizado o meio de cultura não inoculado. Os resultados foram expressos em porcentagem utilizando-se o controle como referência (100 %).

4.6. Consumo de glicerol industrial em diferentes concentrações pelos fungos *P. solitum* e *S. strictum*

Os fungos foram crescidos em meio SR (conforme item 4.2) contendo glicerol industrial nas concentrações de 0,5 a 20 % como fonte de carbono e sob agitação (110 rpm) a 30 °C. Alíquotas foram retiradas a cada 24 h por um período de até 192 h e submetidas à avaliação do consumo de glicerol utilizado o kit de triglicérides (Labtest ref. 87) e 10 μ L do extrato bruto. As leituras de absorbância foram realizadas em leitora de microplacas em 505 nm. Como controle e padrão foram utilizadas amostras do meio de cultura não inoculado e uma solução de glicerol comercial 2 mg/mL (QHEMIS), respectivamente. Os resultados foram expressos em miligrama por decilitro (mg/dL).

4.7. Consumo de glicerol usando a massa celular, extrato intra e extracelular de *S. strictum*

Após 168 h de crescimento em meio SR (conforme item 4.2), o meio de cultura foi centrifugado a $8.000 \times g$ por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado como extrato extracelular e a massa celular obtida foi lavada com água destilada e dividida em duas partes de igual massa (4 g): metade foi conservada em geladeira, a outra metade foi congelada por um período de 2 h e, então, macerada com areia seguido da adição de 3 mL de tampão McIlvaine pH 5,0 contendo Triton™ X-100 (1 %). As amostras foram centrifugadas a $8.000 \times g$ por 3 min a 4 °C e os sobrenadantes obtidos foram utilizados como extrato intracelular. Com o objetivo de iniciar as reações em condições semelhantes, a quantidade de proteína presente em todos os extratos obtidos foi avaliada e convenientemente ajustada.

Os meios reacionais foram constituídos de três partes: 1) 4 g de massa celular + 3 mL de tampão McIlvaine pH 5,0 + 1 % de glicerol industrial (v/v); 2) 3 mL de extrato intracelular + 1 % de glicerol industrial (v/v); 3) 3 mL de extrato extracelular + 1 % de glicerol industrial (v/v). As misturas foram submetidas a 37 °C em banho-maria por um período de até 24 h. Alíquotas de 300 μ L foram retiradas nos tempos de 0, 120, 240, 480 e 1440 min, aquecidas em banho fervente por 5 min e, então, submetidas à dosagem de glicerol. Como controle, 3 mL do tampão contendo 1 % de glicerol foi submetido às mesmas condições anteriormente descritas.

4.8. Purificação da lipase extracelular de *S. strictum*

4.8.1. Cromatografia em coluna de troca iônica

Um volume de 1757 mL de amostra bruta foi ajustado com tampão fosfato de sódio pH 7,5 (concentração final de 50 mM). Posteriormente, a amostra foi aplicada em coluna cromatográfica de troca iônica com dimensões de 3 cm x 16 cm (diâmetro x altura), contendo 60 mL de resina de DEAE-celulose previamente equilibrada com o mesmo tampão. Coletou-se frações de 4 mL, que foram posteriormente submetidas a dosagem enzimática e leitura de proteína em 280 nm. Após a lavagem da coluna, procedeu-se a eluição das proteínas adsorvidas, utilizando-se 850 mL de gradiente linear de 0 a 2 M de NaCl em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5, em que foram coletadas frações de 2 mL. As frações com atividade lipolítica foram unidas e dialisadas contra água destilada. O volume final obtido foi submetido à dosagem enzimática e proteica conforme itens 4.3 e 4.4, respectivamente.

4.8.2. Cromatografia em coluna de exclusão molecular

O volume obtido da coluna de troca iônica foi liofilizado e suspenso em 12 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 6,5, contendo NaCl 100 mM. A suspensão foi aplicada em coluna de exclusão molecular com dimensões de 4,5 cm x 60,5 cm (diâmetro x altura), contendo a resina Sephacryl S-200 pré-equilibrada com o mesmo tampão. A eluição das proteínas foi avaliada pela coleta de frações de 2 mL, que foram submetidas a dosagem enzimática e leitura de proteína. As frações que apresentaram atividade lipolítica foram unidas e dialisadas contra água destilada.

4.8.3. Cromatografia em coluna de interação hidrofóbica

Para purificação em coluna de interação hidrofóbica, ajustou-se a amostra de 66 mL obtida da coluna de exclusão molecular (Sephacryl S-200), com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0 e NaCl 1 M, que foi aplicada em 5 mL de resina Octyl-sepharose previamente equilibrada com o mesmo tampão contendo NaCl 1 M. Coletou-se frações de 1,5 mL que foram submetidas à dosagem enzimática e leitura de proteína. Em sequência, aplicou-se 50 mL de tampão contendo NaCl 1 M e Triton™ X-100 3 %, que foi coletado em um único volume. Posteriormente, a amostra coletada foi submetida à atividade lipolítica conforme o item 4.3. A solução resultante foi dialisada contra água destilada e reservada para realização dos processos de imobilização.

4.8.4. Análise eletroforética em condição desnaturante (SDS-PAGE)

Objetivando-se verificar o grau de pureza obtido, a cada etapa de purificação foram realizadas análises em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE) conforme metodologia de Laemmli (1970). Amostras contendo entre 13 e 35 μ g de proteína foram submetidas a um concentrador de bancada e em seguida, suspensas em 55 μ L de tampão e aquecidas em banho fervente por 5 min com posterior aplicação em gel de poliacrilamida com concentração de 9 %. Para verificação do peso molecular da enzima utilizou-se marcador de peso molecular Bio-Rad (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards). As amostras de proteínas foram coradas segundo a metodologia de Blum *et al.* (1987) com nitrato de prata.

4.9. Caracterização bioquímica parcial da lipase

4.9.1. Efeito do pH e temperatura na atividade da enzima

Para determinar o efeito do pH na atividade da enzima após os processos de purificação, foram utilizados os seguintes tampões: McIlvaine pH 3,0 a 8,0; glicina 100 mM pH 9,5; e CAPS 100 mM pH 10,5, em que submeteu-se a enzima à reação por 5 min a 50 °C conforme descrito no item 4.3. Para determinação da temperatura ótima de atividade da enzima purificada, foi utilizado tampão McIlvaine pH 5,0 e temperaturas na faixa de 30 a 60 °C com intervalos de 5 °C. Em ambas as avaliações foram utilizadas *p*-NPP como substrato de reação. As atividades relativas foram calculadas utilizando os maiores resultados de atividade enzimática como referência (100 %).

4.9.2. Efeito do pH na estabilidade enzimática

Para determinar o efeito do pH na estabilidade enzimática, o extrato bruto foi incubado por até 120 min em tampão McIlvaine pH 5,0 a 8,0 na proporção de 1:1 (v/v) a 4 °C. Alíquotas de 100 µL foram retiradas em intervalos predeterminados e submetidas à dosagem enzimática. A atividade enzimática residual foi determinada utilizando-se tampão acetato 200 mM pH 5,0, contendo *p*-NPP como substrato de reação submetido 50 °C por 5 min. Como controle, foram utilizadas alíquotas das enzimas sem incubação. As atividades relativas foram calculadas utilizando-se o controle como referência (100 %).

4.9.3. Estabilidade da enzima na presença de surfactantes e detergentes

Para determinar o efeito de surfactantes e detergentes sobre a atividade enzimática, amostras da enzima purificada foram incubadas na presença dos seguintes efetores: SDS, goma arábica, Triton™ X-100, TWEEN® 20 e TWEEN® 80, nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,5 e 1 % (m/v ou v/v), por um período de até 60 min à temperatura ambiente. Alíquotas foram retiradas nos tempos de 30 e 60 min e a atividade residual avaliada por incubação em tampão McIlvaine pH 5,0 a 40 °C por 5 min, usando-se *p*-NPP como substrato. O controle consistiu da enzima submetida às mesmas condições de ensaio apenas na presença de tampão.

4.9.4. Estabilidade da enzima na presença de solventes orgânicos

Para determinação da estabilidade da lipase na presença de solventes orgânicos, a enzima foi submetida à incubação por 24 h a 4 °C em DMSO, metanol, acetonitrila, etanol, acetona, isopropanol e n-butanol na proporção de 1:1 (v/v). A atividade residual foi realizada

em tampão McIlvaine pH 5,0 a 40 °C por 5 min, usando-se *p*-NPP como substrato. Como controle utilizou-se a enzima sem a incubação com solventes.

4.9.5. Especificidade da enzima ao substrato

Para determinação da especificidade ao substrato, a atividade lipolítica foi avaliada por incubação da enzima a 40 °C por 5 min, utilizando-se os substratos sintéticos *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA – C2), *p*-nitrofenil miristato (*p*-NPM – C14), *p*-nitrofenil octanoato (*p*-NPO – C8) e *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP – C16), preparados em tampão McIlvaine pH 5,0 na concentração de 0,03 g (m/v) ou 0,03 mL para o substrato líquido (v/v), conforme descrito no item 4.3. A unidade enzimática (U) de lipase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar um micromol do *p*-nitrofenol (*p*-NP) por minuto ($\mu\text{mol/min}$) nas condições de ensaio. Os resultados foram expressos em atividade específica (U/mg).

4.10. Imobilização da lipase de *S. strictum*

Para a imobilização da lipase de *S. strictum* parcialmente purificada foram utilizados os seguintes suportes: CNBr-Activated Sepharose[®] 4B, glioxil-agarose, MANAE-agarose e alginato de sódio.

O suporte CNBr-Activated Sepharose[®] 4B foi tratado de acordo com o protocolo do fabricante (Sigma-Aldrich[®]). Após o tratamento, a resina foi imediatamente adicionada a 10 mL de solução enzimática previamente equilibrada com o mesmo tampão e mantida em contato com a enzima sob agitação branda por um período de 4 h em temperatura ambiente. Após esse período, uma alíquota da suspensão e do sobrenadante foi retirada e submetida à dosagem de atividade. O derivado final foi filtrado e ressuspendido em solução de etanolamina 1 M pH 8,0 por 2 h para bloqueio dos grupos reativos remanescentes.

O suporte glioxil-agarose foi preparado a partir do gliceril-agarose conforme Guisán (1988). A imobilização foi realizada utilizando-se 10 mL de solução enzimática ajustada com solução de bicarbonato 100 mM pH 10,02, que foi misturada a 1 g de suporte glioxil-agarose. A mistura foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por um período de 3 h. Após este período, o derivado foi lavado com água destilada e mantido em geladeira para testes posteriores. Periodicamente, alíquotas da suspensão e do sobrenadante foram retiradas a cada 30 min e submetidas à dosagem de atividade lipolítica conforme item 4.3.

MANAE-agarose foi preparado a partir do glioxil-agarose conforme Fernandez-Lafuente *et al.* (1993). Para a imobilização foram usados 5 mL de solução enzimática

contendo Triton™ X-100 3 % em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0 adicionados a 1 g de suporte. A mistura foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por um período de 3 h. Periodicamente, alíquotas da suspensão e do sobrenadante foram retiradas e submetidas à dosagem de atividade lipolítica conforme item 4.3. Após este período, o derivado foi lavado com água destilada e mantido em geladeira para testes posteriores.

O aprisionamento em esferas de alginato de cálcio foi realizado utilizando-se a enzima parcialmente purificada contendo Triton™ X-100 3 %, que foi misturada a uma solução de alginato de sódio 2 % dissolvido em água destilada na proporção de 1:1 (v/v). A mistura foi gotejada com auxílio de uma seringa em uma solução de cloreto de cálcio 0,1 M (CaCl₂), submetida a uma agitação branda e constante em temperatura ambiente. Após a formação do complexo cálcio-alginato, as esferas foram mantidas na solução de cloreto de cálcio por 2 h ainda sob agitação, para estabilização do complexo. Em seguida, as esferas foram lavadas com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e armazenadas a 4 °C para uso em estudos posteriores.

4.10.1. Efeito do reuso sobre a atividade da lipase imobilizada em alginato de cálcio

Para avaliação do efeito do reuso na atividade lipolítica, as esferas contendo a lipase de *S. strictum* aprisionada foram submetidas à reação por 5 min a 40 °C, utilizando-se tampão McIlvaine pH 5,0 contendo *p*-NPP como substrato. A cada ciclo de reuso as esferas foram lavadas com solução de cloreto de cálcio 0,1 M para manter a estabilidade das esferas, evitando a perda da enzima. Devido à formação de precipitado ocasionada pelo cloreto de cálcio residual da lavagem após a adição do tetraborato de sódio saturado, os tubos foram centrifugados por 1 min a 1500 ×g antes da realização da leitura em leitor de microplaca. A atividade residual dos ciclos de reuso foi calculada utilizando-se o primeiro ciclo como referência (100 %).

4.11. Reprodução dos testes

Os testes foram realizados em triplicata e os valores finais foram apresentados com média e desvio padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 1

5.1. Seleção de fungos produtores de lipase em meio líquido

Por facilitar a recuperação das enzimas de interesse, a produção de lipases em meio líquido é considerada vantajosa (Singh e Mukhopadhyay, 2012; Facchini *et al.*, 2015). Uma vez que o fator de indução dessas enzimas é a fonte de carbono (Singh e Mukhopadhyay, 2012), suplementar o meio de cultura líquido com materiais lipídicos, em geral óleos, é considerado importante indutor na produção de lipases (Facchini *et al.*, 2015). De acordo com Facchini *et al.* (2016), algumas espécies fúngicas apresentam preferências a determinados ácidos graxos, o que influencia na produção dessas enzimas. Alguns gêneros conhecidos como bons produtores de lipase são: *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Candida*, *Humicola*, *Cunninghamella* e *Aspergillus* (Sreelatha *et al.*, 2017).

Quando se busca aperfeiçoar um processo de produção de biomoléculas, pensa-se na utilização em processos industriais procurando atender a demanda necessária e aumentar os rendimentos (Robert, 2015). Portanto, avaliar as condições de crescimento é um processo importante nesse estudo. Desse modo, foi avaliado o tempo de crescimento sob agitação e a influência de diferentes fontes de carbono na produção das lipases extracelulares a partir dos cinco fungos em estudo. O fungo *S. strictum* destacou-se na produção lipolítica quando crescido em glicerol industrial (3,13 U/mg) e óleo de girassol (2,63 U/mg) (Figura 4A). Já o fungo *P. solitum* apresentou pico de produção em azeite de oliva (0,48 U/mg) (Figura 4C). Ambos exibiram máxima produção enzimática em 168 h de crescimento (Figura 4).

Os demais fungos apresentaram produção insatisfatória em todas as fontes de carbono testadas. Já em condição estacionária, não houve produção de lipase (resultados não mostrados).

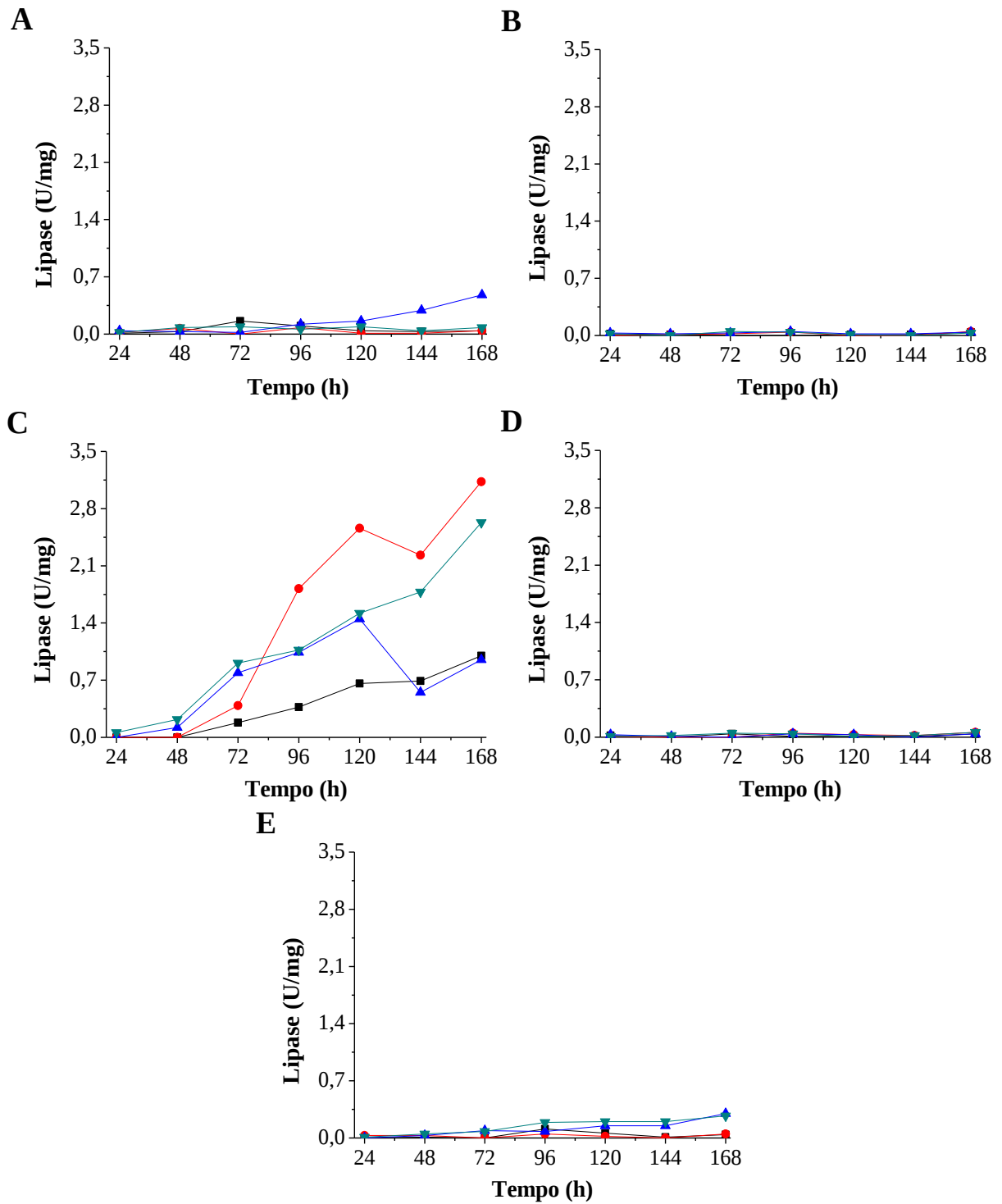


Figura 4. Efeito do tempo de crescimento e de diferentes fontes de carbono na produção das lipases extracelulares. (A) *P. solitum*; (B) *Penicillium* sp.1; (C) *S. strictum*; (D) *Aspergillus* sp.; (E) *Penicillium* sp.2. Os fungos foram crescidos sob agitação (110 rpm) a 30 °C em meio SR com 1 % (v/v) das seguintes fontes de carbono: (■) glicose; (●) glicerol industrial; (▲) óleo de oliva; (▼) óleo de girassol.

Okeke e Okolo (1990) verificaram a produção de lipase usando o fungo *S. strictum* crescido com xilose como fonte de carbono durante sete dias em condição estacionária. A produção de lipase também foi observada com o fungo *Fusarium verticillioides* em óleo de girassol como fonte de carbono (Facchini *et al.*, 2015), enquanto *Penicillium* sp. estudado por Lima *et al.* (2014) crescido em óleo de oliva apresentou pico de produção de 0,28 U/mL em 120 h.

Os resultados demonstraram que o fungo *S. strictum* estudado nesse trabalho produziu lipase mesmo utilizando-se fontes de carbono consideradas não indutoras. Resultado semelhante foi obtido por Costa *et al.* (2017), que observaram produção de lipase por *Aspergillus niger* crescido em farelo de arroz e glicerol.

5.2. Caracterização parcial das lipases extracelulares obtidas a partir dos fungos *P. solitum* e *S. strictum*

Após a verificação do melhor tempo de crescimento e fonte indutora para a produção das lipases, os dois melhores fungos foram usados nos testes de consumo de glicerol - apresentados e discutidos na Parte 2 desse trabalho - e nos procedimentos de caracterização bioquímica da enzima em estado bruto. Já na etapa de purificação e caracterização da enzima foi usado apenas o fungo *S. strictum*, uma vez que esse microrganismo expressou maior quantidade de lipase extracelular.

5.2.1. Efeito do pH na atividade enzimática

O fungo *P. solitum* apresentou um pico de atividade em pH 5,0, com queda de 50 % em pH 4,0 e 6,0. Já a lipase de *S. strictum* teve um pico de atividade em pH 5,0, mantendo atividade acima de 98 % em pH 6,0 e 7,0 quando crescido em óleo de girassol e atividade acima de 80 % quando crescido em glicerol industrial (Figura 5).

Geralmente, as lipases apresentam elevada atividade em pH alcalino, como foi observado por Bakir e Metin (2016) ao testar uma lipase alcalina termoestável de *Anoxybacillus flavithermus*, que apresentou atividade em pH superior a 6,5. Lipase de *A. alcalophilum* com atividade dupla (lipase xilana acetil esterase) apresentou pH ótimo em 8,0 (Pereira *et al.*, 2013), enquanto uma lipase purificada de *Bacillus sphaericus* estudada por Tamilarasan e Kumar (2012) apresentou alta estabilidade entre pH 6,0 e 9,0.

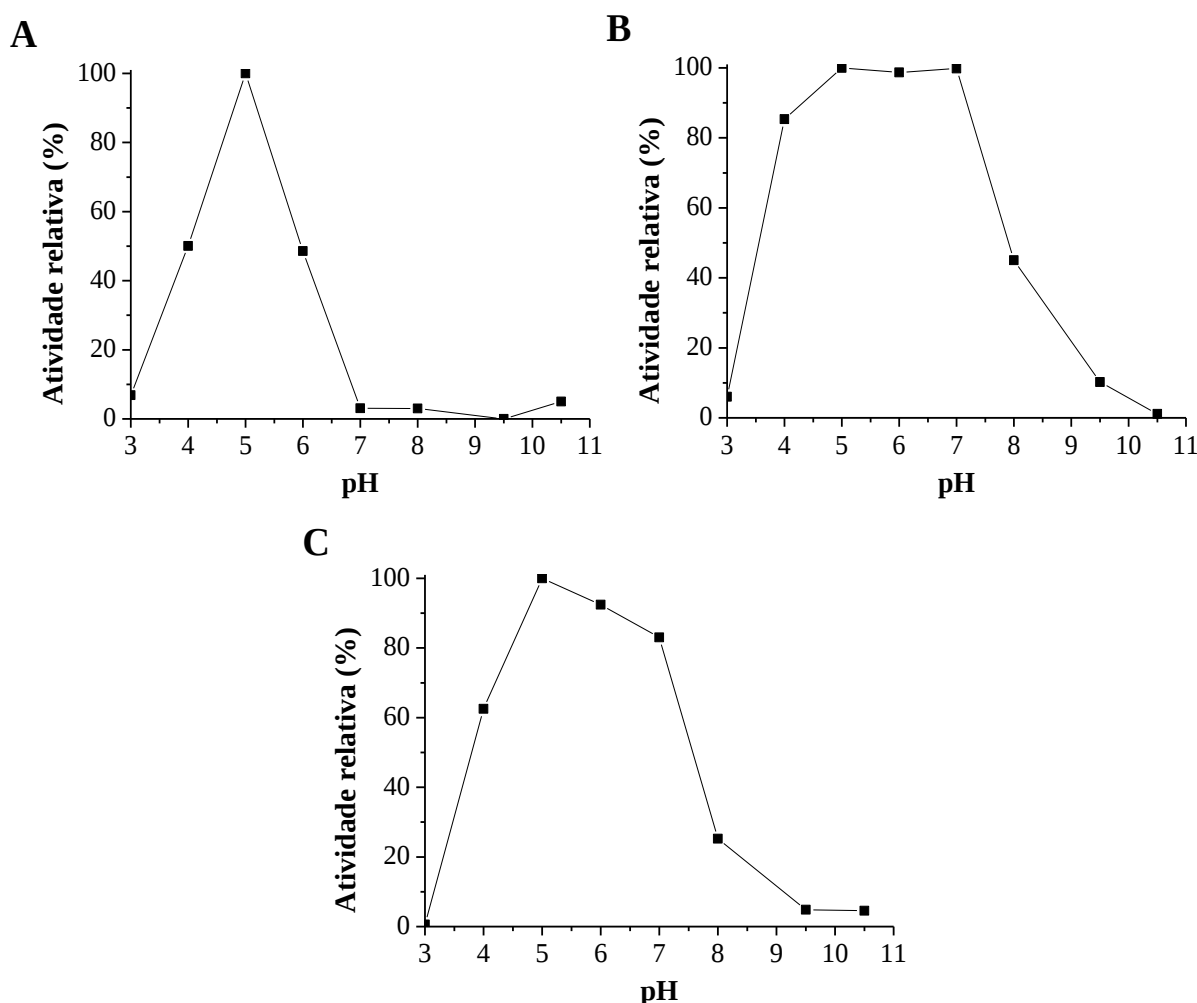


Figura 5. Efeito do pH na atividade lipolítica dos fungos *S. strictum* e *P. solitum*. (A) *P. solitum* crescido em óleo de oliva; (B) *S. strictum* crescido em óleo de girassol; (C) *S. strictum* crescido em glicerol industrial. As atividades relativas foram calculadas utilizando-se como referência a maior atividade obtida (100 %).

5.2.2. Efeito do pH na estabilidade enzimática

Na indústria, as enzimas precisam manter-se estáveis quando submetidas a determinadas temperaturas e pH. Dessa forma, foi avaliada a estabilidade da enzima na faixa de pH de 5,0 a 8,0. A lipase produzida por *S. strictum* crescido em óleo de girassol e glicerol industrial, manteve 100 % da sua estabilidade pelo período de 120 min em todos os pH testados, enquanto que *P. solitum* crescido em óleo de oliva, foi estável pelo mesmo período em pH 7,0 e 8,0 mantendo 80 % da atividade em pH 5,0 e 6,0 (Figura 6).

A lipase de *Hypocrea pseudokoningii* apresentou estabilidade na faixa de pH de 3,0-8,0 (Pereira *et al.*, 2014), enquanto que as lipases de *Penicillium simplicissimum* produzidas a partir de bagaço de babaçu tiveram meia-vida superior a 5 h em pH 5,0 (Gutarra *et al.*, 2009).

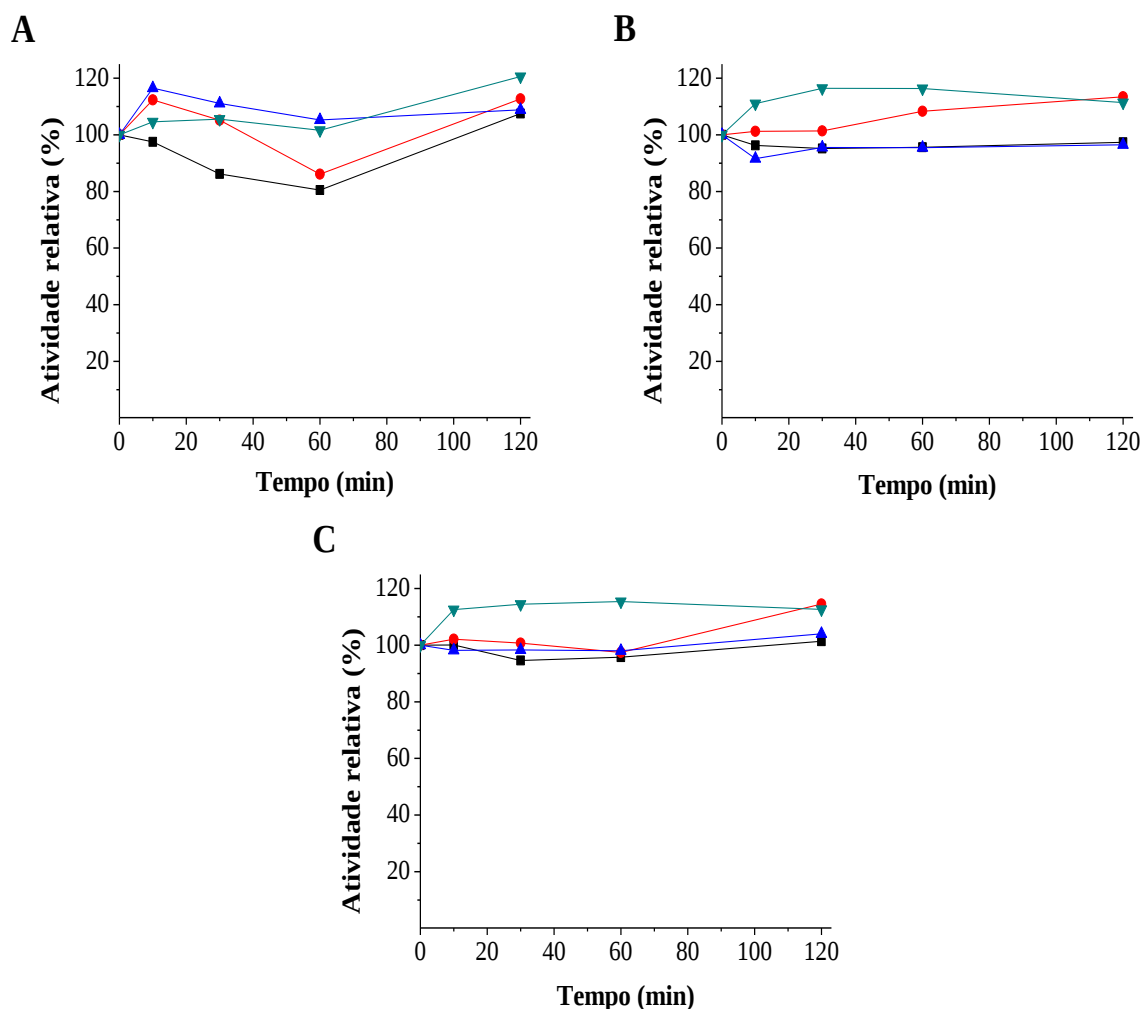


Figura 6. Efeito do pH na estabilidade enzimática. (A) *P. solitum* crescido em óleo de oliva; (B) *S. strictum* crescido em glicerol industrial; (C) *S. strictum* crescido em óleo de girassol. A enzima foi incubada por até 120 min a 4 °C em tampão McIlvaine pH (■) 5,0; (●) 6,0; (▲) 7,0; (▼) 8,0. As atividades relativas foram calculadas utilizando-se como referência a maior atividade obtida (100 %).

5.3. Purificação da lipase extracelular de *S. strictum*

Dentre os microrganismos produtores de lipase, os fungos recebem grande atenção, uma vez que produzem enzimas extracelulares que são facilmente extraídas e purificadas (Geoffry e Achur, 2018). Em processos de purificação que partem do extrato bruto, que

normalmente contém um grande número de proteínas, é importante aplicar procedimentos rigorosos de purificação quando se busca eficiência e alto rendimento (Volpato *et al.*, 2010). Desse modo, para a purificação da lipase de *S. strictum* utilizou-se três métodos cromatográficos como segue na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Purificação da lipase produzida por *S. strictum*.

Etapas	Volume (mL)	Atividade total (U)	Proteínas totais (mg)	Atividade específica (U/mg)	Purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	1757	2428,2	808,2	3,0	1	100
DEAE-celulose	370	1447,4	78,4	18,4	6,1	59,61
Sephacryl S-200	66	695,6	14,4	48,1	16,0	28,65
Octyl-sepharose	43,5	391,7	5,3	73,2	24,4	16,1

O primeiro passo para a purificação da lipase de *S. strictum* foi realizada em coluna de troca iônica, utilizando-se resina DEAE-celulose equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5. O perfil cromatográfico resultante desse passo da purificação está apresentado na Figura 7A. Após a eluição utilizando-se um gradiente linear de 0 a 2 M de NaCl, foi obtido um fator de purificação de 6,1 e rendimento de 59,61 % (Tabela 1).

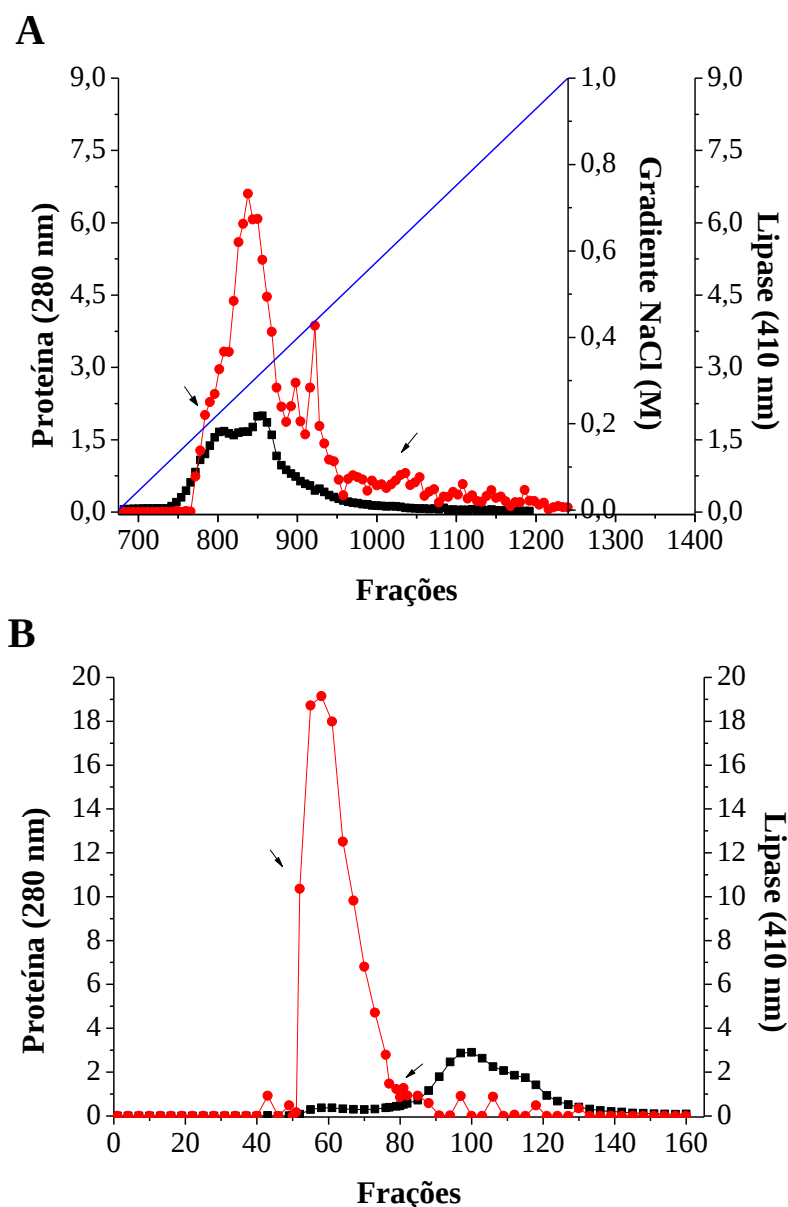


Figura 7. Perfil cromatográfico de lipase de *S. strictum* em diferentes colunas de purificação. (A) troca iônica em resina DEAE-celulose; (B) exclusão molecular em resina Sephacryl S-200. (■) proteína (280 nm); (●) lipase U/mL (410 nm); (—) gradiente contínuo de NaCl (0→1 M). As setas indicam as frações reunidas.

No segundo passo de purificação (coluna de exclusão molecular) usando a resina Sephacryl S-200, observou-se um único pico de atividade; entretanto, com uma base ligeiramente alargada (Figura 7B). Foi obtido um fator de purificação de 16,0 e rendimento de 28,65 % (Tabela 1).

As lipases apresentam forte caráter hidrofóbico, que em muitos casos promove a formação de agregados e devido a isso, tem-se utilizado com maior frequência cromatografias

de interação hidrofóbica (Lima, 2004). Assim, o volume obtido da segunda etapa de purificação foi aplicado em resina Octyl-sepharose. A eluição da lipase foi realizada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0 contendo NaCl 1 M e Triton™ X-100 3 %. Devido à interferência desse detergente na leitura de absorbância em 280 nm, realizou-se a coleta em único volume. Nessa etapa, foi obtido um fator de purificação de 24,4 vezes e rendimento de 16,1 % (Tabela 1).

5.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Cada etapa de purificação foi acompanhada por análise eletroforética para verificação do grau de pureza da amostra obtida e estimativa da massa molecular da enzima (Figura 8).

Para realização do gel utilizou-se marcador de peso molecular contendo padrões com massa de 20 a 250 kDa (Figura 8A). Na Figura 8B observam-se duas bandas proteicas resultantes da purificação em octyl-sepharose: a majoritária de aproximadamente 52 kDa, que consideramos ser a lipase e outra com cerca de 62 kDa, considerada contaminante. O gel obtido da amostra purificada, quando comparado ao gel da amostra bruta (Figura 8C) observa-se que um grande número de contaminante foi eliminado ao longo do processo de purificação.

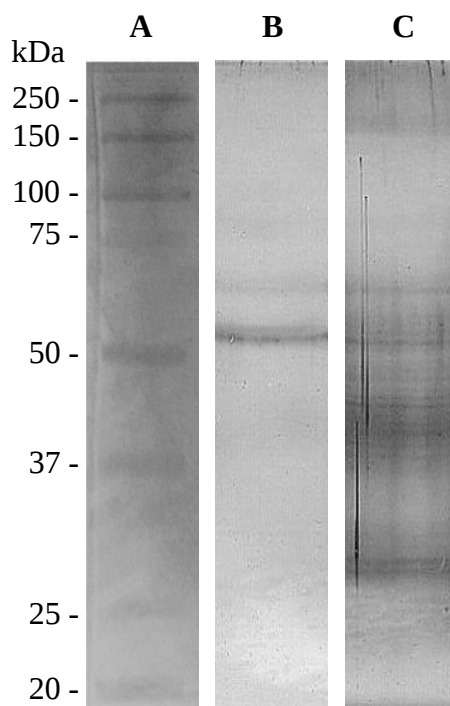


Figura 8. Perfil eletroforético da lipase parcialmente purificada de *S. strictum* em condição desnaturante SDS-PAGE 9 %. (A) marcador de peso molecular; (B) enzima parcialmente purificada (13 μ g); (C) amostra bruta (35 μ g). As bandas proteicas foram reveladas com nitrato de prata.

De acordo com a literatura, o peso molecular das lipases microbianas parecem ser bastante heterogêneo, encontrando-se pesos entre 28 e 82 kDa (Abreu *et al.*, 2014; Bakir e Metin, 2016; Hemamalini e Khare, 2016; Bernal *et al.*, 2017; Edupuganti *et al.*, 2017).

5.4. Caracterização bioquímica parcial da lipase de *S. strictum* parcialmente purificada

O número de estudos realizados com lipases aumentou nos últimos anos, principalmente com publicações relativas à sua aplicação industrial (Singh e Mukhopadhyay, 2012). No entanto, pouco relato tem sido atribuído às enzimas produzidas por *S. strictum*, em especial as lipases (Goldbeck *et al.*, 2013). Dessa forma, para o enriquecimento e aprimoramento de informações que compreendem as áreas biotecnológicas de enzimas sintetizadas por esse fungo, novos estudos com esse microrganismo são pertinentes. Assim, o passo seguinte foi caracterização parcial da enzima lipolítica de *S. strictum*.

5.4.1. Efeito do pH e temperatura na atividade da lipase parcialmente purificada

A enzima de *S. strictum* (Figura 9) exibiu atividade lipolítica máxima em pH 5,0, que foi mantida acima de 50 % até o pH 7,0. Esse mesmo pH foi observado por Sen *et al.* (2016) para a lipase parcialmente purificada de *Streptomyces lienomycini*.

Na avaliação do efeito da temperatura (Figura 10) observou-se que entre 30 a 40 °C, a enzima parcialmente purificada de *S. strictum* exibiu desempenho superior a 80 %, mantendo atividade máxima em 40 °C. Nota-se sensível queda em 45 °C, porém, mantendo atividade acima de 50 %. Nas demais temperaturas a atividade reduziu gradualmente, mantendo-se em 20 % em 60 °C.

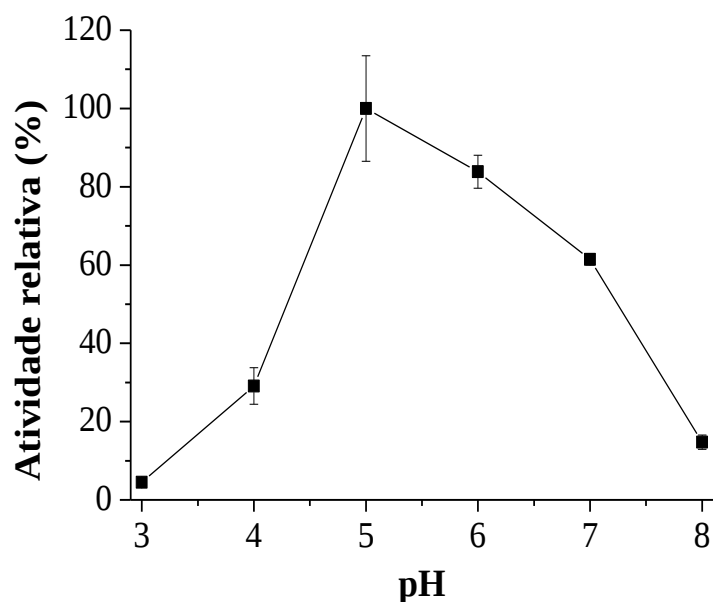


Figura 9. Efeito do pH na atividade lipolítica da enzima parcialmente purificada do fungo *S. strictum*. As atividades relativas foram calculadas utilizando-se como referência a maior atividade obtida (100 %).

A lipase purificada de *Microbacterium* sp., estudada por Tripathi *et al.* (2014) apresentou atividade máxima a 50 °C, perdendo aproximadamente 40 % da atividade em 40 °C.

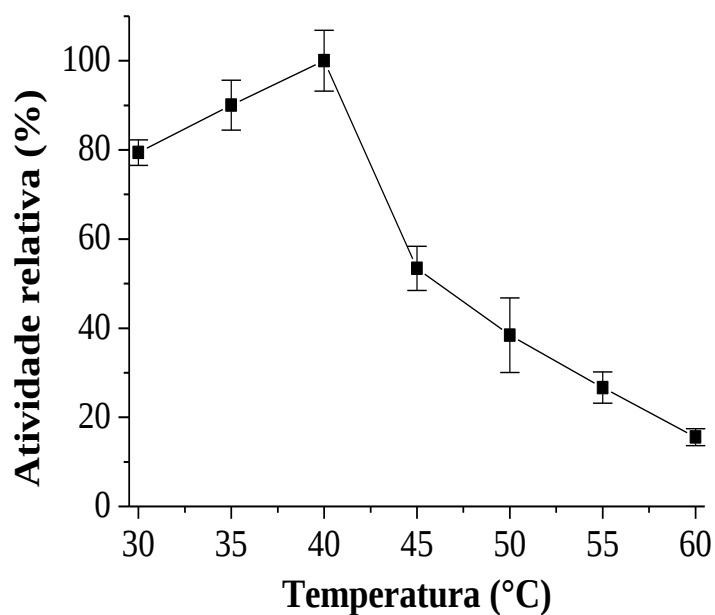


Figura 10. Efeito da temperatura na atividade lipolítica da enzima parcialmente purificada do fungo *S. strictum*. As atividades relativas foram calculadas utilizando-se como referência a maior atividade obtida (100 %).

5.4.2. Estabilidade da lipase parcialmente purificada na presença de surfactantes e detergentes

O efeito da atividade lipolítica na presença de detergentes foi realizado submetendo-se a enzima a diferentes concentrações de efetores (0,05; 0,1; 0,5 e 1 %) por até 60 min à temperatura ambiente. Na Tabela 2 observou-se aumento de atividade de 8,55 % em TWEEN® 80 0,1 % nos primeiros 30 min, enquanto que nas concentrações de 0,05 e 0,5 % a atividade foi aumentada, respectivamente, em 7,41 e 3,99 % quando comparado ao controle nos 30 min. A enzima foi ativada por Triton™ X-100 em até 10,45 %, mantendo atividades acima de 100 % nas concentrações de 0,05, 0,1 e 1 %. Em goma arábica, a atividade foi reduzida em 6,93 e 37,26 %, enquanto o efeito inibitório de TWEEN® 20 variou entre 1,42 e 10,54 %.

Tabela 2. Efeito de surfactante e detergentes na atividade da lipase parcialmente purificada de *S. strictum*.

Detergentes	Tempos (min)	Controle	Concentração (%)			
			0,05	0,1	0,5	1
Controle	30	100 ± 0,47				
	60	100 ± 1,35				
SDS	30		2,94 ± 4,16	1,23 ± 1,75	0,00	0,76 ± 1,07
	60		2,26 ± 1,85	4,72 ± 5,70	0,00	0,00
Goma arábica	30		81,01 ± 12,20	88,6 ± 4,42	93,07 ± 5,47	92,21 ± 4,51
	60		62,74 ± 6,99	68,87 ± 8,35	79,25 ± 13,55	89,06 ± 8,59
Triton™ X-100	30		103,13 ± 7,92	110,45 ± 11,61	99,15 ± 3,52	101,04 ± 9,13
	60		102,55 ± 4,39	103,3 ± 7,12	95,47 ± 7,47	82,45 ± 14,75
TWEEN® 20	30		101,42 ± 10,64	89,46 ± 10,34	94,87 ± 10,07	94,97 ± 3,76
	60		97,08 ± 8,47	99,53 ± 3,08	95,38 ± 12,61	96,32 ± 5,57
TWEEN® 80	30		107,41 ± 12,26	108,55 ± 8,78	103,99 ± 9,15	96,11 ± 8,49
	60		86,79 ± 14,26	99,81 ± 6,57	96,98 ± 0,48	88,96 ± 5,78

A lipase parcialmente purificada foi incubada na presença dos efetores nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,5 e 1 % (m/v ou v/v) por até 60 min à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em porcentagem utilizando-se o valor do controle (sem adição de efetor) como referência (100 %). A dosagem da atividade residual foi obtida em condição ótima de temperatura (40 °C) utilizando-se tampão McIlvaine pH 5,0 e *p*-NPP como substrato.

A lipase de *Fusarium oxysporum* avaliada por Ângelo *et al.* (2014) manteve aproximadamente 50 % da atividade quando submetida ao Triton™X-100 e foi fortemente inibida por SDS e TWEEN® 80, causando perda de atividade lipolítica em mais de 80 % em todas as concentrações testadas (0,5 a 3,0 %). Resultado semelhante foi observado por Tripathi *et al.* (2014) com a lipase de *Microbacterium* sp., que foi inibida na presença de TWEEN® 20 e TWEEN® 80.

5.4.3. Estabilidade da lipase parcialmente purificada na presença de solventes

Com relação às reações biocatalíticas, as lipases ocupam um lugar importante nos processos realizados em meios aquosos e não aquosos (Mehta *et al.*, 2017). No que se refere aos meios não aquosos, muitas dessas reações ocorrem junto a solventes orgânicos. Dentre os gêneros que se destacam na produção de lipases estáveis em solventes estão *Galactomyces* (Maldonado *et al.*, 2016) e *Aspergillus* (Contesini *et al.*, 2017).

Os efeitos dos solventes sobre a atividade lipolítica dependem tanto das peculiaridades da enzima como dos próprios solventes a que são submetidas (Pereira *et al.*, 2015). Além disso, a estabilidade em ambientes orgânicos é uma característica importante para essa categoria de biomoléculas, uma vez que o maior interesse é a aplicação em processos biossintéticos que requerem um ambiente não aquoso (Salihu e Alam, 2015).

Desse modo, a lipase parcialmente purificada de *S. strictum* foi testada na presença de solventes orgânicos na proporção de 1:1 (v/v), por um período de até 24 h a 4 °C. Os efeitos são apresentados na Figura 11, onde se observa atividade de 80 % na presença de metanol e próximo de 60 % em DMSO e acetona. Nos demais solventes a atividade da lipase não foi satisfatória, mantendo-se abaixo de 50 %.

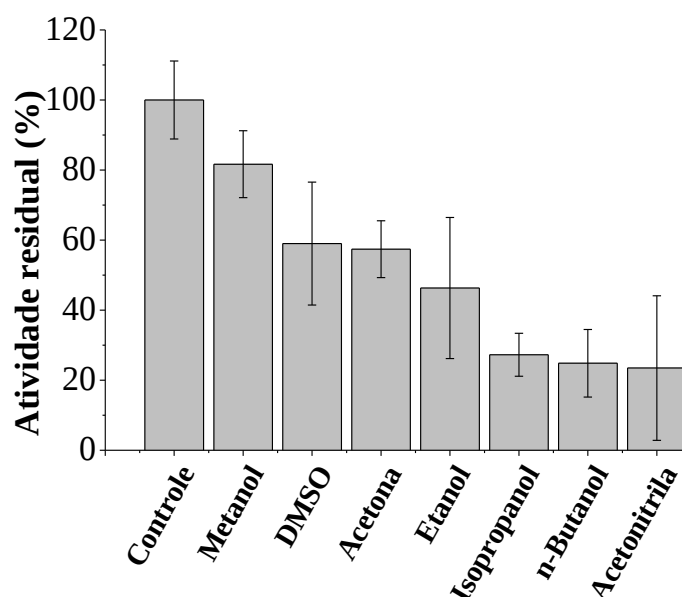


Figura 11. Efeito de solventes orgânicos na atividade da lipase parcialmente purificada de *S. strictum*. Os resultados estão expressos em porcentagem utilizando-se o resultado controle como referência (100 %).

O mesmo perfil de estabilidade exibido pela lipase de *S. strictum* em alguns solventes foi observado por outros autores. Hemamalini e Khare (2016), ao avaliarem uma lipase de *Marinobacter* sp., observaram uma estabilidade de 23 % em isopropanol, enquanto a lipase da bactéria termofílica *Bacillus* sp. estudada por Li e Liu (2017) foi totalmente inibida por DMSO.

Diversos trabalhos reportam bons resultados para estabilidade de lipases em metanol, assim como observado para a lipase de *S. strictum* (Almeida *et al.*, 2013; Wongwatanapaiboon *et al.*, 2016; Bernal *et al.*, 2017). Tais resultados são interessantes para a indústria do biodiesel, uma vez que o processo de transesterificação dos glicerídeos ocorre frequentemente na presença de metanol (Ugur *et al.*, 2014).

5.4.4. Especificidade da lipase parcialmente purificada ao substrato

Para que as lipases possam ser empregadas nos setores industriais, algumas características bioquímicas como a afinidade a determinados substratos deve ser considerada (Syal e Gupta, 2017). A especificidade da enzima é controlada tanto pelas suas propriedades como as características do substrato e compreender os aspectos particulares pode permitir o aprimoramento dos parâmetros das reações de interesse, além de aumentar as possibilidades de aplicação (Treichel *et al.*, 2016).

Desse modo, foi determinada a especificidade ao substrato pelo acompanhamento da hidrólise de ésteres de *p*-nitrofenil formados por ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia. Os resultados são apresentados na Figura 12. Dentre os substratos testados, o *p*-NPO apresentou maior suscetibilidade à ação da lipase (8,71 U/mg), representando uma atividade duas vezes maior do que a observada para as demais cadeias. Com *p*-NPM e *p*-NPP, os valores de atividade foram inferiores, ficando em 4,09 e 2,82 U/mg, respectivamente. Não foi possível acompanhar a hidrólise do *p*-NPA (C2), devido à ocorrência de hidrólise espontânea do substrato nas condições de ensaio. A hidrólise espontânea de substratos sintéticos de cadeia curta também foi relatada por Turati (2015).

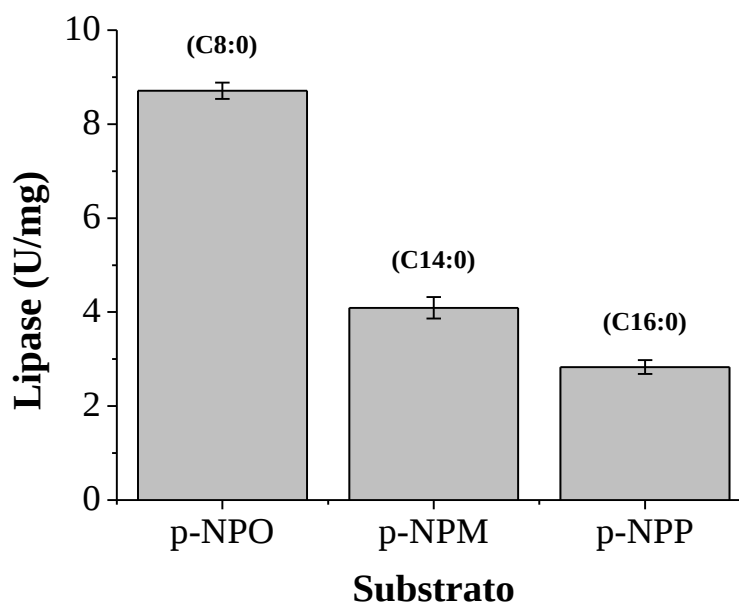


Figura 12. Atividade da lipase parcialmente purificada de *S. strictum* frente a diferentes substratos. Resultados expressos em atividade específica (U/mg). Legenda: *p*-NPO: *p*-nitrofenil octanoato; *p*-NPM: *p*-nitrofenil miristato; *p*-NPP: *p*-nitrofenil palmitato.

Outras lipases foram relatadas com maior atividade sobre ésteres de cadeias carbônicas médias (C8-C10). A lipase recombinante de *Fusarium solani* observada por Jallouli *et al.* (2017) apresentou maior atividade com trioctanoína, um substrato de oito carbonos. Já a lipase de *Y. lipolytica* foi mais efetiva com substrato de cadeia pequena (C4-C6) (Syal e Gupta, 2017), enquanto que a lipase de *Proteus* sp. exibiu maior atividade em cadeia carbônica longa (C11-C16) (Wang *et al.*, 2017).

5.5. Imobilização da lipase de *S. strictum*

As características particulares dos suportes pode propiciar rápida imobilização da enzima. Vieira *et al.* (2011) imobilizaram celobiase comercial em suportes de troca iônica (DEAE-celulose e PEI-agarose) e observaram adsorção de quase toda a enzima após 2 h. Outros suportes podem ser selecionados para a realização de imobilizações. Desse modo, utilizou-se CNBr-Activated Sepharose® 4B, glioxil-agarose, MANAE-agarose e alginato de sódio para a imobilização da lipase em estudo.

O processo de imobilização realizado com os suportes CNBr-Activated Sepharose® 4B, glioxil-agarose e MANAE-agarose apresentaram-se ineficazes, uma vez que a enzima não apresentou atividade ou não aderiu aos suportes testados (resultados não apresentados).

5.5.1. Aprisionamento em esferas de alginato de cálcio

O processo de imobilização deve ser realizado em condições amenas a fim de não ocasionar a desnaturação da enzima (Zhang *et al.*, 2013). Por ser um procedimento rápido, fácil, atóxico e econômico, o aprisionamento é um dos métodos de imobilização mais empregado, pois não induz a mudanças conformacionais severas ou impede o acesso do substrato à enzima. (Anwar *et al.*, 2009).

É, portanto, frequentemente empregado o uso de alginato por conta da sua propriedade de geleificação branda e atóxica (Won *et al.*, 2005). Desse modo, foi realizada a imobilização da lipase de *S. strictum* por aprisionamento usando-se alginato com posterior avaliação dos efeitos do reuso das esferas contendo a lipase.

5.5.1.1. Efeito do reuso sobre a atividade da lipase imobilizada em alginato de cálcio

Um dos principais objetivos da imobilização é a possibilidade de realizar usos sucessivos do mesmo derivado imobilizado; portanto, foram testados 4 ciclos de reuso para o derivado de alginato de cálcio. Como apresentado na Figura 13, a lipase reteve 70 % de atividade ainda no segundo ciclo e 30 % no terceiro.

Objetivando impedir a liberação da enzima pela desintegração das esferas, estas foram lavadas com solução de cloreto de cálcio 0,1 M entre ciclos de reuso. Como observado na Figura 13, até o quarto ciclo de reuso observou-se uma queda acentuada da atividade lipolítica, que pode ser resultado, ou de algum possível efeito inibitório da solução de cloreto de cálcio sobre a atividade ou a lixiviação da enzima ao longo das sucessivas lavagens.

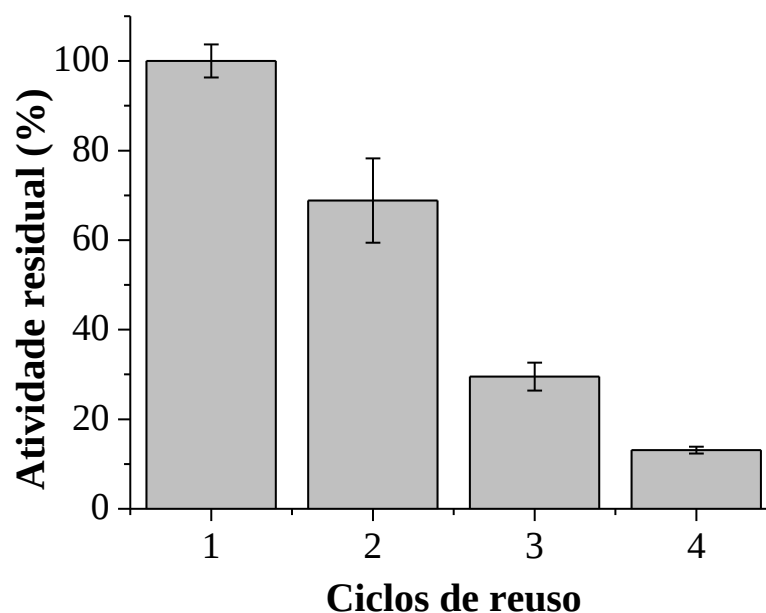


Figura 13. Ciclos de reuso da lipase de *S. strictum* imobilizada em alginato de cálcio. A atividade residual foi calculada utilizando-se como referência o resultado obtido no primeiro ciclo (100 %).

Resultado semelhante foi encontrado por Knezevic *et al.* (2002), que observaram queda acentuada da atividade lipolítica da enzima de *C. rugosa* ao longo do teste de reuso. De acordo com os autores, três possíveis razões podem ter ocasionado este efeito: extravasamento da enzima, acúmulo de substrato ou produto no interior das esferas ou, ainda, danos causados a elas, uma vez que foi observada redução do diâmetro das mesmas durante os usos repetidos.

Segundo o trabalho de Zhang *et al.* (2013), a lipase comercial de *Candida antarctica* imobilizada em esferas de alginato manteve alta atividade após seis ciclos de reuso. De acordo com estes autores, o alginato é carregado negativamente devido à presença dos grupos funcionais carboxílicos, assim, a imobilização realizada com pH abaixo do pI da enzima de *C. antártica* (6,0) a manteve carregada positivamente, promovendo uma adsorção mais efetiva a rede de alginato reduzindo o vazamento de enzimas.

Poucos trabalhos envolvendo o aprisionamento de lipases em esferas de alginato foram encontrados na literatura, o que abre possibilidades de novos estudos com tal metodologia de imobilização.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 2

Aqui serão apresentados os dados obtidos a partir do estudo utilizando o glicerol industrial como fonte de carbono no meio de cultura.

6.1. Perfil de consumo de diferentes concentrações de glicerol industrial por *P. solitum* e *S. strictum*

Um dos eventos físico-químicos que promovem o crescimento da célula fúngica é a pressão de turgor, diferença de pressão hidrostática que deforma a parede celular (González-Bermúdez *et al.*, 2017). De acordo com Griffin (1994), existe uma estreita relação entre os solutos presentes no interior da célula e os efeitos dessa pressão hidrostática. Assim, para esse autor, uma vez que não há mecanismo de transporte ativo para a água em células fúngicas, o glicerol funciona como um dos compostos osmorregulatórios mais influentes no controle da pressão. Portanto, o glicerol presente no meio de cultura em determinadas concentrações é um composto capaz de afetar a integridade da célula fúngica.

Desse modo, foram testadas diferentes concentrações de glicerol industrial (0,5 a 20 %) no crescimento dos fungos *P. solitum* e *S. strictum*. O consumo foi quantificado conforme item 4.6. Na Figura 14, observou-se que ambos os fungos apresentaram captação constante de glicerol industrial ao longo do período avaliado. Nos meios de cultura com concentrações de 0,5, 1 e 2 %, *P. solitum* consumiu 100 % glicerol disponível após 168, 96 e 144 h de crescimento, respectivamente, enquanto *S. strictum* consumiu 100 % do glicerol disponível nos meios de cultura com concentrações de 0,5 e 1 % em 48 h, 2 % em 96 h e 4 % em 120 h.

Na concentração de 20 % não foi observado crescimento dos fungos. Já nas concentrações de 8 a 15 % houve crescimento microbiano, contudo, não foi possível quantificar o consumo de glicerol devido à concentração elevada deste composto (resultados não apresentados).

Em trabalhos que avaliaram o consumo de glicerol em meios de cultura foi possível observar que este composto é rapidamente assimilado pelos microrganismos. Crescendo *Pischia pastoris* usada na expressão heteróloga de lipase, Robert (2015) observou absorção total do glicerol industrial 4 % (m/v) em 18 h de crescimento.

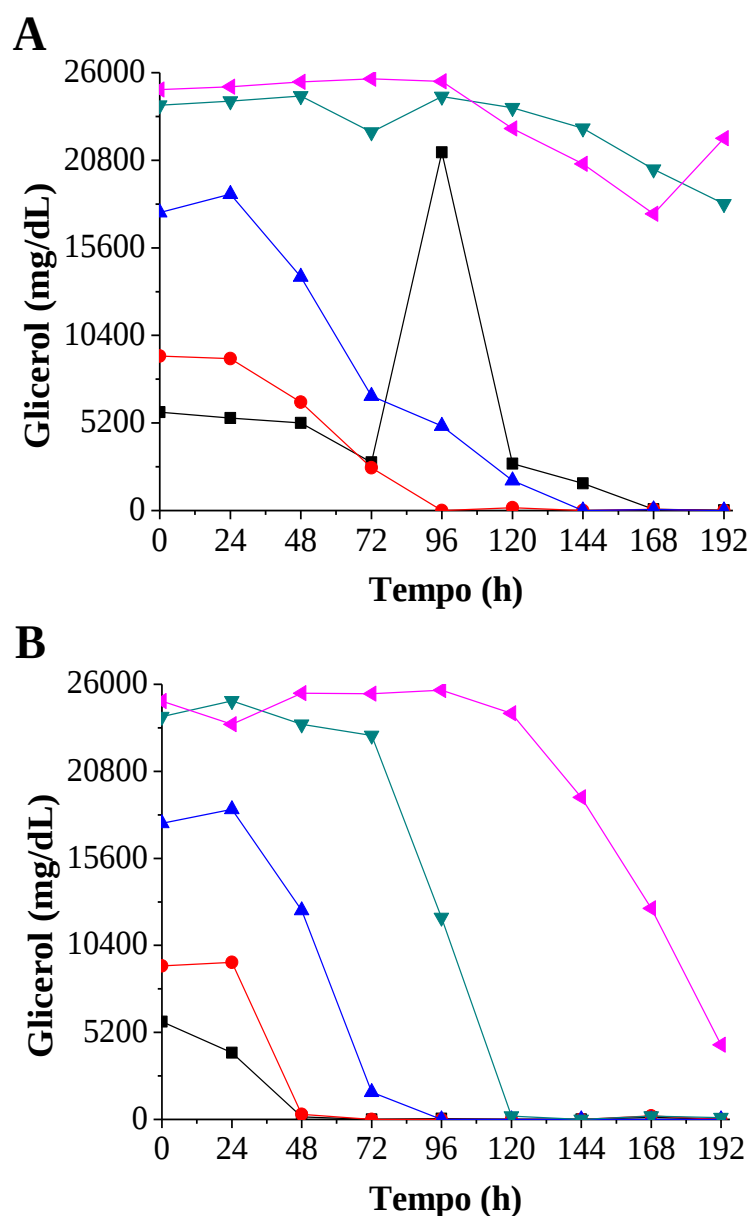


Figura 14. Determinação de consumo de glicerol industrial em função do tempo de crescimento dos fungos. (A) *P. solitum* (B) *S. strictum*. Os fungos foram crescidos em meio SR com diferentes concentrações de glicerol industrial (0,5- 20 %) como fonte de carbono. (■) 0,5 %; (●) 1 %; (▲) 2 %; (▼) 4 %; (◆) 6 %. Controle: concentração de glicerol quantificada no tempo zero de crescimento. Resultados apresentados em mg/dL.

6.2. Consumo de glicerol utilizando a massa celular, extrato intra e extracelular

O glicerol, por ser um composto orgânico prontamente disponível em toda a natureza, compondo fosfolipídios de membrana e os lipídios de armazenamento, permitiu a diversos organismos encontrar meios de captá-lo e metabolizá-lo como fonte de energia (Klein *et al.*, 2017). Compreender os mecanismos de captação do glicerol pode ajudar a

explorar de modo mais eficiente seu uso como fonte de carbono em meios de cultura e, possivelmente, sugerir aplicações biotecnológicas que visem valorizar o excesso de glicerol gerado pela indústria do biodiesel. Assim, foi avaliado o consumo do glicerol a partir do micélio e extratos extra e intracelular de *S. strictum*.

Como apresentado na Figura 15, o micélio de *S. strictum* consumiu mais de 50 % do glicerol nas primeiras 2 h de avaliação. Contrariamente, os extratos extra e intracelular não apresentaram consumo do composto, mas sim a produção acima do observado no controle, variando em concentrações de até 15 % em 4 e 24 h para o extrato extracelular e 8,35 % em 8 h para o intracelular.

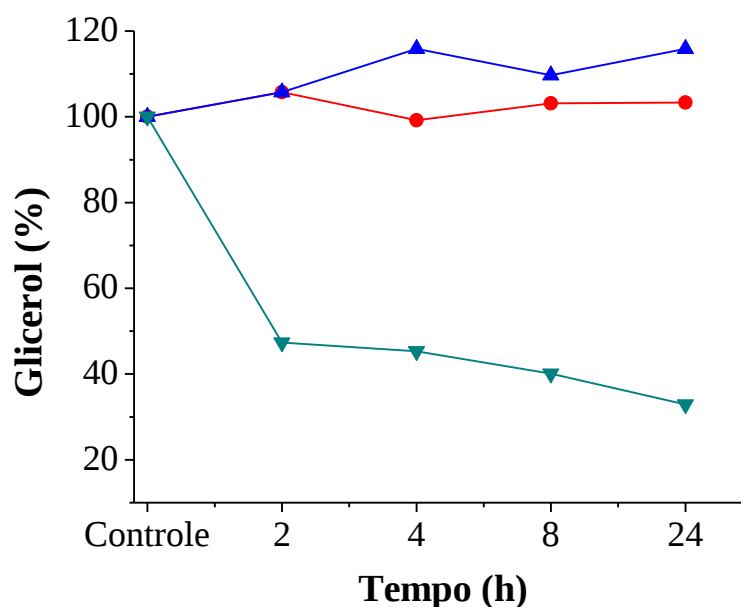


Figura 15. Consumo de glicerol pela massa celular, extrato intra e extracelular do fungo *S. strictum*. Os componentes avaliados: (●) Extrato intracelular; (▲) Extrato extracelular; (▼) Massa celular.

De modo a atuar como fonte de energia, o glicerol deve primeiramente ser captado pela célula e os mecanismos de captação são extensivamente estudados em *Saccharomyces cerevisiae*. Acredita-se que nesse modelo de estudo, a captação ocorra por meio de um sistema simporte-glicerol/ H^+ codificado por STL1 (Klein *et al.*, 2017) e também por um sistema de transporte ativo como sugere Sutherland *et al.* (1997).

Os resultados obtidos nesse experimento sugerem a presença de um sistema de captação fortemente ativo na membrana celular do fungo *S. strictum*, o que corrobora os

resultados apresentados na Figura 14A, no qual foi possível observar que este mesmo organismo foi capaz de captar 1 % de glicerol industrial presente no meio de cultura já nas primeiras 48 h de crescimento.

6.3. Determinação da concentração de açúcar redutor no meio de cultura utilizando glicerol industrial como fonte de carbono

Os fungos *S. strictum* e *P. solitum* foram crescidos em glicerol industrial e alíquotas foram retiradas para quantificação de açúcar redutor e glicose no meio de cultura, numa tentativa de verificar se os fungos poderiam estar convertendo o glicerol nesses compostos. Nas Figura 16A e 16B observou-se um aumento na concentração de açúcares redutores. Os valores de concentração de glicose do meio de cultura avaliados via glicose oxidase se mostraram próximos de zero (resultados não mostrados).

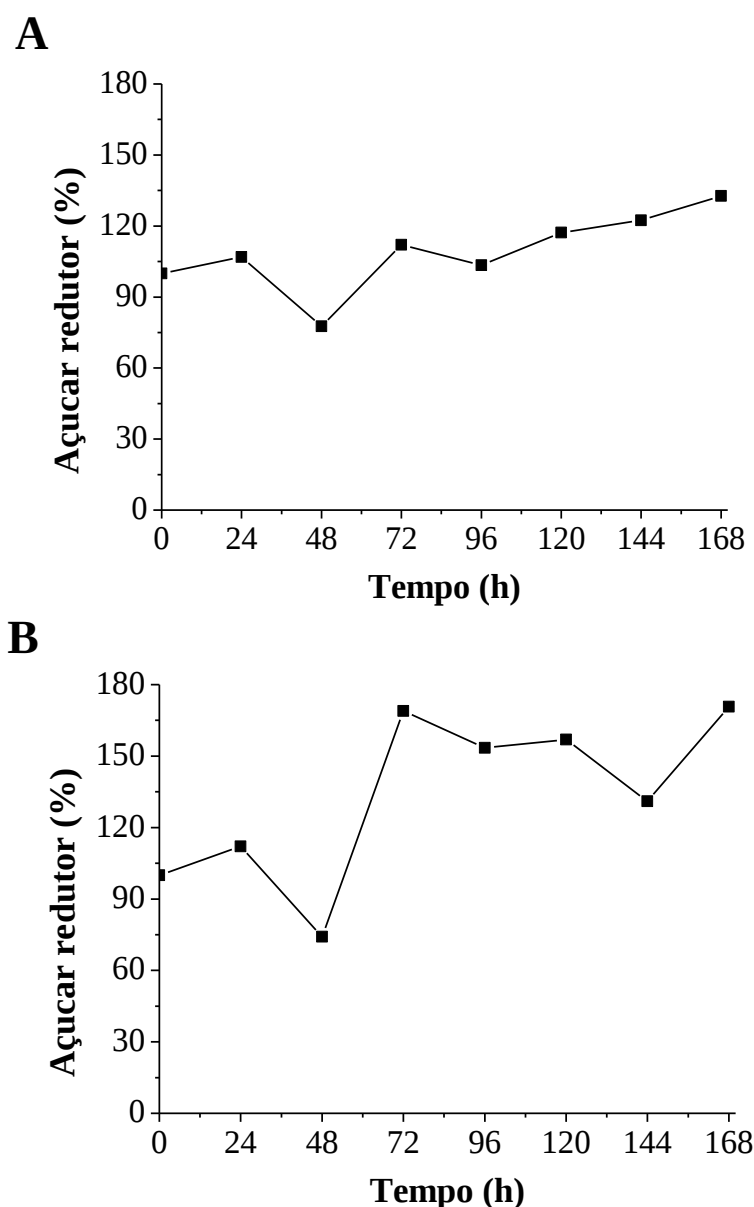


Figura 16. Determinação da concentração de açúcares redutores no meio de cultura. (A) *P. solitum* (B) *S. strictum*. Os resultados foram expressos em porcentagem, utilizando-se o controle como 100 % (meio de cultura sem incubação).

Himmi *et al.* (2000) realizaram um estudo comparativo entre os processos de fermentação de *Propionibacterium acidipropionici* e *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* para a produção de ácido propiônico, a partir do consumo e conversão de glicerol e de glicose. Os autores observaram que o glicerol foi a fonte de carbono e de energia mais eficiente para a produção do ácido e que *P. acidipropionici* apresentou a taxa de conversão mais eficiente. É possível, então, que o glicerol industrial usado como fonte de carbono seja convertido em outros compostos energéticos, já que sua captação ocorre por difusão

facilitada, como observado em *S. cerevisiae* (Islam, 2016), por transporte ativo pela proteína STL1 em *S. cerevisiae* e *Candida alba* e também pela proteína GUP1 pertencente ao grupo das O-aciltransferases ligadas à membrana (Li *et al.*, 2013).

A tecnologia de bioconversão do glicerol, que usa microrganismos para o metabolismo fermentativo (Yazdani e Gonzalez, 2007), inclui também a síntese de 1,3-propanediol (Zhou *et al.*, 2017), ácido propanoico (Himmi *et al.*, 2000), ácido cítrico (Papanikolaou *et al.*, 2017) e ácido oxálico (André *et al.*, 2010).

7. CONCLUSÃO

A purificação da lipase de *S. strictum* envolveu três métodos cromatográficos resultando em uma purificação parcial. Com relação ao pH ótimo, a enzima não apresentou diferença entre as condições bruta e parcialmente purificada e, na condição bruta, foi 100 % estável na faixa de pH testada (5,0 a 8,0). A enzima parcialmente purificada foi mais ativa na temperatura de 40 °C e manteve boa estabilidade na presença de surfactantes, detergentes e metanol, com especificidade hidrolítica a substratos contendo ácidos graxos de cadeia média (*p*-NPO – C8). A imobilização foi efetiva em alginato de sódio, enquanto que em CNBr-Activated Sepharose[®] 4B, glioxil-agarose e MANAE-agarose a imobilização foi ineficaz. Foi observado alto consumo de glicerol industrial por *S. strictum*, mesmo quando crescido em meio de cultura suplementado em diferentes concentrações.

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o fungo *S. strictum* apresenta produção de uma possível lipase constitutiva e que pode atender a intensa demanda industrial. Além disso, por apresentar boa estabilidade em metanol, a lipase desse microrganismo tem potencial para uso tanto na indústria do biodiesel como em reações que ocorrem em condições brandas. Ademais, devido ao perfil de consumo de glicerol, *S. strictum* pode ser um forte candidato na área de transformação química do glicerol derivado da indústria do biodiesel em produtos de valor agregado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L. D. *et al.* Efficient purification-immobilization of an organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 on porous styrene-divinylbenzene beads. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 51-55, 2014. ISSN 1381-1177.
- ALMEIDA, A. F. D. *et al.* Acid Lipase from *Candida viswanathii*: Production, Biochemical Properties, and Potential Application. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 10, 2013.
- ANDRÉ, A. *et al.* Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 407-416, 2010. ISSN 0926-6690.
- ÂNGELO, T. *et al.* Concomitant production of peptidases and lipases by fungus using agroindustrial residue in solid-state fermentation. **Internation Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 5, p. 810-823, 2014. ISSN 2319-7706.
- ANWAR, A. *et al.* Calcium alginate: a support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. **World Applied Sciences Journal**, v. 7, n. 10, p. 1281-1286, 2009. ISSN 1818-4952.
- ASEFA, D. T. *et al.* Yeast diversity and dynamics in the production processes of Norwegian dry-cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1, p. 135-140, 2009. ISSN 0168-1605.
- BAKIR, Z. B.; METIN, K. Purification and characterization of an alkali-thermostable lipase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 1087-1097, 2016. ISSN 1017-7825.
- BANSAL, K. *et al.* Thin layer chromatography and image analysis to detect glycerol in biodiesel. **Fuel**, v. 87, n. 15-16, p. 3369-3372, 2008. ISSN 0016-2361.
- BARBOSA, O. *et al.* Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 435-456, 2015. ISSN 0734-9750.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; TARRAGÓ-CASTELLANOS, M. R. **Solid-State Fermentation: Special Physiology of Fungi**. In: MERILLON, J.-M. e RAMAWAT, K. G. (Ed.). **Fungal Metabolites**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p.1-29. ISBN 978-3-319-19456-1.
- BASTIDA, A. *et al.* A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486-493, 1997.
- BERNAL, L. F. *et al.* Response Surface Methodology (RSM) for analysing culture conditions of *Acidocella facilis* strain USBA-GBX-505 and Partial Purification and Biochemical Characterization of Lipase 505 LIP. **Universitas Scientiarum**, v. 22, n. 1, p. 26, 2017. ISSN 2027-1352.
- BHARTI, M. K. *et al.* Purification and Characterization of Lipase From *Aspergillus japonicas*: A Potent Enzyme for Biodiesel Production. **National Academy Science Letters**, v. 36, n. 2, p. 151-156, 2013. ISSN 2250-1754.

BLUM, H. *et al.* Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.

BORNSCHEUER, U. T. Enzymes in Lipid Modification. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 85-103, 2018.

BRASIL. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2016**. ANP-AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. N. E. B. Rio de Janeiro: Ministério de Minas e Energia, 2016.

CHANDORKAR, V. *et al.* Production of lipase by Immobilized Cells of *Aspergillus niger*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 8, p. 703-707, 2014.

CHATZIFRAGKOU, A. *et al.* Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**, v. 36, n. 2, p. 1097-1108, 2011. ISSN 0360-5442.

CHRISTOPHER, L. P. *et al.* Enzymatic biodiesel: challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014. ISSN 0306-2619.

COLLA, L. M. *et al.* Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8308-8314, 2010. ISSN 0960-8524.

CONTESINI, F. J. *et al.* *Aspergillus* Lipases: Biotechnological and Industrial Application. In: MÉRILLON, J.-M. e RAMAWAT, K. G. (Ed.). **Fungal Metabolites**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p.639-666. ISBN 978-3-319-25001-4.

CONTESINI, F. J. *et al.* *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 3, p. 163-171, 2010. ISSN 1381-1177.

COSTA, M. C. **Produção, purificação e caracterização de lipase de *Aspergillus* sp.** 1996. 107 f. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

COSTA, T. M. *et al.* Lipase production by *Aspergillus niger* grown in different agro-industrial wastes by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, p. 419-427, 2017. ISSN 0104-6632.

D'ANNIBALE, A. *et al.* Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1828-1833, 2006. ISSN 0960-8524.

EDUPUGANTI, S. *et al.* Purification and Characterization of Extracellular Lipase from *Staphylococcus epidermidis* (MTCC 10656). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 01, p. 057-063, 2017.

ELLAIAH, P. *et al.* Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 525-528, 2004. ISSN 1359-5113.

FACCHINI, F. *et al.* Immobilization Effects on the Catalytic Properties of Two *Fusarium Verticillioides* Lipases: Stability, Hydrolysis, Transesterification and Enantioselectivity Improvement. **Catalysts**, v. 8, n. 2, p. 84, 2018. ISSN 2073-4344.

FACCHINI, F. D. A. *et al.* Optimization of fibrolytic enzyme production by *Aspergillus japonicus* C03 with potential application in ruminant feed and their effects on tropical forages hydrolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 8, p. 1027-1038, 2011. ISSN 1615-7605.

FACCHINI, F. D. A. *et al.* Enhanced lipase production of *Fusarium verticillioides* by using response surface methodology and wastewater pretreatment application. **Journal of Biochemical Technology**, v. 6, n. 3, p. 996-1002, 2015. ISSN 0974-2328.

FACCHINI, F. D. A. *et al.* A useful method to select lipase-catalyzed transesterification aiming biodiesel application. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 10, n. 1, p. 01-13, 2016. ISSN 2359-6724.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. *et al.* Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808-1825, 2013. ISSN 0734-9750.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. *et al.* Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 7, p. 546-550, 1993. ISSN 0141-0229.

FERREIRA, M. M. *et al.* Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 55-63, 2018. ISSN 1359-5113.

GARLAPATI, V. K. *et al.* Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. **Biotechnology Reports**, v. 9, p. 9-14, 2016. ISSN 2215-017X.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 241-253, 2018. ISSN 1878-8181.

GEWEELY, N. S. Investigation of the Optimum Condition and Antimicrobial Activities of Pigments from Four Potent Pigment-Producing Fungal Species. **Journal of Life Sciences**, v. 5, p. 697-711, 2011.

GHOSH, P.; GHOSH, U. Bioconversion of Agro-waste to Value-Added Product Through Solid-State Fermentation by a Potent Fungal Strain *Aspergillus flavus* PUF5. In: (Ed.). **Utilization and Management of Bioresources**: Springer, 2018. p.291-299.

GIRALDO, A. *et al.* Phylogeny of *Sarocladium* (*Hypocreales*). **Persoonia**, v. 34, p. 10-24, 2015. ISSN 0031-5850.

GOLDBECK, R. *et al.* Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 797-803, 2013. ISSN 0960-8524.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, n. 3, p. 267-285, 1998. ISSN 0169-409X.

GONZÁLEZ-BERMÚDEZ, B. *et al.* Probing the effect of tip pressure on fungal growth: Application to *Aspergillus nidulans*. **Physical Review E**, v. 96, n. 2, p. 022402, 2017.

GRAUPNER, M. *et al.* Molecular Dynamics of Microbial Lipases as Determined from Their Intrinsic Tryptophan Fluorescence. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 1, p. 493-504, 1999. ISSN 0006-3495.

GRICAJEVA, A. *et al.* Analysis of *Aspergillus* sp. lipase immobilization for the application in organic synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 1165-1175, 2018. ISSN 0141-8130.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2 ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 458 p. ISBN 0471166154.

GUIMARÃES, L. H. S. *et al.* Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 474-480, 2006. ISSN 1517-8382.

GUISÁN, J. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 375-382, 1988. ISSN 0141-0229.

GURUNG, N. *et al.* A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 18, 2013.

GUTARRA, M. L. E. *et al.* Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5249-5254, 2009. ISSN 0960-8524.

HAAS, M. J.; BAILEY, D. G. Glycerol as a carbon source for lipase production by the fungus *Rhizopus delemar*. **Food Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 49-73, 1993. ISSN 0890-5436.

HAKIMZADEH, V.; SADEGHI, A. Techniques for Immobilization and Detection of Lipase: A Review. **Chemistry Research Journal**, v. 2, n. 6, p. 214-224, 2017. ISSN 2455-8990.

HASAN, F. *et al.* Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006. ISSN 0141-0229.

HE, Q. *et al.* Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 63-76, 2017. ISSN 1364-0321.

HEMAMALINI, R.; KHARE, S. Purification and Characterization of Active Aggregates of an Organic Solvent Tolerant Lipase from *Marinobacter* sp. EMB5. **Insights Enzyme Research**, v. 1, n. 1:3, p. 8, 2016.

HIDALGO, M.; PUERTA-FERNÁNDEZ, E. Fermentation of glycerol by a newly discovered anaerobic bacterium: adding value to biodiesel production. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 528-530, 2017. ISSN 1751-7915.

HIMMI, E. H. *et al.* Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 4, p. 435-440, 2000. ISSN 1432-0614.

ILMI, M. *et al.* Utilisation of Jatropha press cake as substrate in biomass and lipase production from *Aspergillus niger* 65I6 and *Rhizomucor miehei* CBS 360.62. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 103-107, 2017. ISSN 1878-8181.

IMANPARAST, S. *et al.* Enzymatic esterification of acylglycerols rich in omega-3 from flaxseed oil by an immobilized solvent-tolerant lipase from *Actinomadura sediminis* UTM 2870 isolated from oil-contaminated soil. **Food Chemistry**, v. 245, p. 934-942, 2018. ISSN 0308-8146.

- ISLAM, Z.-U. **Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 1,2-propanediol using glycerol as a carbon and energy source**. 2016. 100 p. Thesis (Doctor of Philosophy in Biochemical Engineering). Department of Life Sciences & Chemistry, Jacobs University Bremen, Germany, 2016.
- JAEGGER, K.-E. *et al.* Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 315-351, 1999.
- JALLOULI, R. *et al.* Efficient heterologous expression of *Fusarium solani* lipase, FSL2, in *Pichia pastoris*, functional characterization of the recombinant enzyme and molecular modeling. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, n. Part A, p. 61-71, 2017. ISSN 0141-8130.
- JEGANNATHAN, K. R. *et al.* Physical and stability characteristics of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in κ -carrageenan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1, p. 78-83, 2009. ISSN 1381-1177.
- KAMAL, M. Z. *et al.* Mutational probing of protein aggregates to design aggregation-resistant proteins. **FEBS Open Bio**, v. 6, n. 2, p. 126-134, 2015.
- KAVITHA, M. Cold active lipases - an update. **Frontiers in Life Science**, v. 9, n. 3, p. 226-238, 2016. ISSN 2155-3769.
- KHAN, F. I. *et al.* The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, n. 16, 2017. ISSN 2296-4185.
- KHANAHMADI, S. *et al.* Optimized preparation and characterization of CLEA-lipase from cocoa pod husk. **Journal of Biotechnology**, v. 202, p. 153-161, 2015. ISSN 0168-1656.
- KHARRAT, N. *et al.* Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1083-1089, 2011. ISSN 1359-5113.
- KHAYOON, M. S.; HAMEED, B. H. Acetylation of glycerol to biofuel additives over sulfated activated carbon catalyst. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9229-9235, 2011. ISSN 0960-8524.
- KLEIN, M. *et al.* The expression of glycerol facilitators from various yeast species improves growth on glycerol of *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering Communications**, v. 3, p. 252-257, 2016. ISSN 2214-0301.
- KLEIN, M. *et al.* Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 878-893, 2017. ISSN 1462-2920.
- KNEZEVIC, Z. *et al.* Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 313-318, 2002. ISSN 1359-5113.
- KUMAR, R.; KESAVAPILLAI, B. Stimulation of extracellular invertase production from spent yeast when sugarcane pressmud used as substrate through solid state fermentation. **SpringerPlus**, v. 1, n. 1, p. 81, 2012. ISSN 2193-1801.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. ISSN 0028-0836.
- LI, A. *et al.* Purification and characterization of halophilic lipase of *Chromohalobacter* sp. from ancient salt well. **Journal of Basic Microbiology**, v. 0, n. 0, p. 1800116, 2018.
- LI, C. *et al.* Microbial Conversion of Waste Glycerol from Biodiesel Production into Value-Added Products. **Energies**, v. 6, n. 9, p. 4739, 2013. ISSN 1996-1073.
- LI, J.; LIU, X. Identification and Characterization of a Novel Thermophilic, Organic Solvent Stable Lipase of *Bacillus* from a Hot Spring. **Lipids**, v. 52, n. 7, p. 619-627, 2017. ISSN 1558-9307.
- LI, N.; ZONG, M.-H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1, p. 43-54, 2010. ISSN 1381-1177.
- LIMA, L. N. D. *et al.* Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent attachment. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 118-123, 2013. ISSN 1359-5113.
- LIMA, R. C. *et al.* Produção de lipases por *Penicillium* sp. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 679-682, 2014. ISSN 2359-1757.
- LIMA, V. M. G. D. **Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos**. 2004. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- LIU, G. *et al.* Improving lignocellulolytic enzyme production with *Penicillium*: from strain screening to systems biology. **Biofuels**, v. 4, n. 5, p. 523-534, 2013. ISSN 1759-7269.
- LIU, Y. *et al.* The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 4, p. 402-407, 2008. ISSN 1350-4177.
- LIU, Y. *et al.* Glycerol/glucose co-fermentation: one more proficient process to produce propionic acid by *Propionibacterium acidipropionici*. **Current Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 152-158, 2011. ISSN 1432-0991.
- LOACES, I. *et al.* Improved glycerol to ethanol conversion by *E. coli* using a metagenomic fragment isolated from an anaerobic reactor. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 10, p. 1405-1416, 2016. ISSN 1476-5535.
- LOWRY, O. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-75, 1951.
- MACH, N. *et al.* Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 2, p. 632-638, 2009.
- MALDONADO, R. *et al.* A Review on *Geotrichum* Lipases: Production, Purification, Immobilization and Applications. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 30, n. 4, p. 439-454, 2016. ISSN 0352-9568.

- MATEO, C. *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007. ISSN 0141-0229.
- MCILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 183-186, 1921.
- MEHTA, A. *et al.* Fungal lipases: a review. **Journal of Biotech Research**, v. 8, p. 58-77, 2017. ISSN 1944-3285.
- MENDES, A. A. *et al.* Immobilization of a Commercial Lipase from *Penicillium camembertii* (Lipase G) by Different Strategies. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 8, 2011.
- MHETRAS, N. C. *et al.* Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1486-1490, 2009. ISSN 0960-8524.
- MILLER, G. Modified DNS method for reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOHAMAD, N. R. *et al.* An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology, Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205-220, 2015. ISSN 1310-2818.
- MOHAMMED, S. *et al.* A gene encoding a new cold-active lipase from an Antarctic isolate of *Penicillium expansum*. **Current Genetics**, v. 59, n. 3, p. 129-137, 2013. ISSN 1432-0983.
- NIELSEN, J. C. **Systems Biology of the Secondary Metabolism in Filamentous Fungi**. 2018. 73 p. Thesis (Doctor Of Philosophy). Department of Biology and Biological Engineering, Chalmers University of Technology, Sweden, 2018.
- NOUT, M. J. R.; AIDOO, K. E. Asian Fungal Fermented Food. In: OSIEWACZ, H. D. (Ed.). **Industrial Applications**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002. p.23-47. ISBN 978-3-662-10378-4.
- OKEKE, C. N.; OKOLO, B. N. The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 10, p. 747-750, 1990. ISSN 1573-6776.
- OLIVEIRA, R. L. D. *et al.* Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 9-18, 2018. ISSN 0960-3085.
- OSHO, M. B. *et al.* Immobilization of *Aspergillus niger* ATCC 1015 on bionatural structures for lipase production. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 4, p. 449-454, 2014.
- PANDA, S. K. *et al.* Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. **Environmental Research**, v. 146, p. 161-172, 2016. ISSN 0013-9351.
- PANDI, A. *et al.* Inexpensive α -amylase production and application for fiber splitting in leather processing. **RSC Advances**, v. 6, n. 39, p. 33170-33176, 2016. ISSN 2046-2069.
- PAPANIKOLAOU, S. *et al.* Production of secondary metabolites through glycerol fermentation under carbon-excess conditions by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and

Rhodospiridium toruloides. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 9, 2017. ISSN 1438-9312.

PATIL, Y. *et al.* Fermentation of glycerol by *Anaerobium acetethylicum* and its potential use in biofuel production. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 203-217, 2017. ISSN 1751-7915.

PEREIRA, E. O. *et al.* The production and characterization of a new active lipase from *Acremonium alcalophilum* using a plant bioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 111, 2013. ISSN 1754-6834.

PEREIRA, M. G. **Produção, purificação e caracterização bioquímica das lipases produzidas pelos fungos termófilos *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* e *Humicola* sp.** 2011. 224 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

PEREIRA, M. G. *et al.* Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 4, p. 561-570, 2015. ISSN 1359-5113.

PEREIRA, M. G. *et al.* Different covalent immobilization modulate *Hypocrea pseudokoningii* lipase activities. **Biotechnology Progress**, p. 32 p., 2016.

PEREIRA, M. G. *et al.* Screening of filamentous fungi for lipase production: *Hypocrea pseudokoningii* a new producer with a high biotechnological potential. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 74-83, 2014. ISSN 1024-2422.

PINHEIRO, T. D. L. F. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo.** 2006. 120 f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos). Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada, Erechim, 2006.

PRADIMA, J. *et al.* Review on enzymatic synthesis of value added products of glycerol, a by-product derived from biodiesel production. **Resource-Efficient Technologies**, v. 3, n. 4, p. 394-405, 2017. ISSN 2405-6537.

QUILLES, J. C. J. *et al.* Modulation of the activity and selectivity of the immobilized lipases by surfactants and solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 274-280, 2014. ISSN 1369-703X.

RAIMONDI, S. *et al.* Getting lipids from glycerol: new perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 83, 2014. ISSN 1475-2859.

RASMEY, A.-H. M. *et al.* Characterization and optimization of lipase activity produced by *Pseudomonas monteilli* 2403-KY120354 isolated from ground beef. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 96-105, 2016. ISSN 1684-5315.

REIS, P. *et al.* Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-148, p. 237-250, 2009. ISSN 0001-8686.

RIFAAT, H. M. *et al.* Production, optimization and partial purification of lipase from *Fusarium oxysporum*. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**, v. 5, n. 1, 2010. ISSN 0126-2807.

RIGOLDI, F. *et al.* Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. **APL Bioengineering**, v. 2, n. 1, p. 011501, 2018.

RIZZATTI, A. C. S. *et al.* Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 156-160, 2001. ISSN 1476-5535.

ROBERT, J. D. M. **Produção de lipase recombinante (Lip B) de *Candida antarctica* em *Pichia pastoris*: Avaliação de meio de cultivo e aumento de escala**. 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

ROBERT, J. M. *et al.* Production of recombinant lipase B from *Candida antarctica* in *Pichia pastoris* under control of the promoter PGK using crude glycerol from biodiesel production as carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 118, p. 123-131, 2016. ISSN 1369-703X.

ROCHA, N. R. D. A. F. *et al.* Ethanol production from agroindustrial biomass using a crude enzyme complex produced by *Aspergillus niger*. **Renewable Energy**, v. 57, p. 432-435, 2013. ISSN 0960-1481.

RÚA, M. L. *et al.* Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*: Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. **Journal of Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 89-102, 1997. ISSN 0168-1656.

RUIZ, B. *et al.* Purification and characterization of an extracellular lipase from *Penicillium candidum*. **Lipids**, v. 36, n. 3, p. 283, 2001. ISSN 1558-9307.

RYWIŃSKA, A. *et al.* Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1217-1224, 2010. ISSN 1573-0972.

SAHOO, R. K. *et al.* Bioprospecting hot spring metagenome: lipase for the production of biodiesel. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 4, p. 3802-3809, 2016. ISSN 1614-7499.

SALAMEH, M. D. A.; WIEGEL, J. Effects of Detergents on Activity, Thermostability and Aggregation of Two Alkalithermophilic Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. **The Open Biochemistry Journal**, v. 4, p. 22-28, 2010. ISSN 1874-091X.

SALIHI, A. *et al.* Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, Part B, p. 827-835, 2017. ISSN 0141-8130.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z. Solvent tolerant lipases: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 86-96, 2015. ISSN 1359-5113.

SANTOS, E. A. L. D. *et al.* Lipase from *Aspergillus niger* obtained from mangaba residue fermentation: biochemical characterization of free and immobilized enzymes on a sol-gel matrix. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, n. 1, 2017. ISSN 1806-2563.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, n. 3, p. 513-521, 1958. ISSN 0006-3002.

SAVITHA, J. *et al.* Identification of potential fungal strain (s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. **African journal of biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 564, 2007. ISSN 1684-5315.

SAXENA, R. K. *et al.* Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 239-247, 2003. ISSN 1359-5113.

SEMKIV, M. *et al.* Biotechnology of Glycerol Production and Conversion in Yeasts. In: SIBIRNY, A. A. (Ed.). **Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p.117-148. ISBN 978-3-319-58829-2.

SEN, B. *et al.* Partial Purification, Characterization and Biodiesel Application of *Streptomyces lienomycini* Lipase. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 21, n. 6, p. 12103-12109, 2016. ISSN 1224-5984.

SETHI, B. K. *et al.* Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 143-149, 2016. ISSN 1517-8382.

SILVA, R. R. D. Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-19, 2017. ISSN 1559-0291.

SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, 2012.

SOUZA, J. V. B. D. *et al.* Bioprospecting with Brazilian Fungi. In: PATERSON, R. e LIMA, N. (Ed.). **Bioprospecting: Success, Potential and Constraints**. Cham: Springer International Publishing, 2017a. p.197-211. ISBN 978-3-319-47935-4.

SOUZA, L. T. D. A. *et al.* Immobilization of *Moniliella spathulata* R25L270 Lipase on Ionic, Hydrophobic and Covalent Supports: Functional Properties and Hydrolysis of Sardine Oil. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1508, 2017b. ISSN 1420-3049.

SOUZA, L. T. D. A. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: RESENDE, R. R. (Ed.). **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. São Paulo: Blucher, v.4, 2017c. p.529 -568.

SREELATHA, B. *et al.* Culture conditions for the production of thermostable lipase by *Thermomyces lanuginosus*. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 1, p. 87-95, 2017. ISSN 2314-8535.

SUMMERBELL, R. C. *et al.* Acremonium phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. **Studies in Mycology**, v. 68, p. 139-162, 2011. ISSN 0166-0616.

SUTHERLAND, F. *et al.* Characteristics of Fps1-dependent and-independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 24, p. 7790-7795, 1997. ISSN 0021-9193.

SYAL, P.; GUPTA, R. Heterologous expression of lipases YLIP4, YLIP5, YLIP7, YLIP13, and YLIP15 from *Yarrowia lipolytica* MSR80 in *Escherichia coli*: Substrate specificity, kinetic comparison, and enantioselectivity. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2017. ISSN 1470-8744.

SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, D. 1,3-Propanediol production from crude glycerol by *Clostridium butyricum* DSP1 in repeated batch. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 322-328, 2014. ISSN 0717-3458.

TAMILARASAN, K.; KUMAR, M. D. Purification and characterization of solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* MTCC 7542. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 309-313, 2012. ISSN 1878-8181.

TAVANO, O. L. *et al.* Optimization of the immobilization of sweet potato amylase using glutaraldehyde-agarose support. Characterization of the immobilized enzyme. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1054-1058, 2013. ISSN 1359-5113.

TOIDA, J. *et al.* Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 7, p. 1199-1203, 1995.

TREICHEL, H. *et al.* A Review on Microbial Lipases Production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010. ISSN 1935-5149.

TREICHEL, H. *et al.* Lipase Production from a newly Isolated *Aspergillus Niger* by Solid State Fermentation using Canola Cake as Substrate. **Current Biotechnology**, v. 5, p. 1-7, 2016.

TREVISAN, H. Lipases. In: SAID, S. e PIETRO, R. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**: Legis Summa, 2004.cap. 7, p.115-135.

TRIPATHI, R. *et al.* Isolation, Purification and Characterization of Lipase from *Microbacterium* sp. and its Application in Biodiesel Production. **Energy Procedia**, v. 54, p. 518-529, 2014. ISSN 1876-6102.

TSANG, C.-C. *et al.* Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era - Past, present and future. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2018. ISSN 2001-0370.

TUDORACHE, M. *et al.* Enhancement of the valorization of renewable glycerol: The effects of the surfactant-enzyme interaction on the biocatalytic synthesis of glycerol carbonate. **Catalysis Today**, v. 279, p. 71-76, 2017. ISSN 0920-5861.

TURATI, D. *et al.* Immobilization of Lipase from *Penicillium* sp. Section *Gracilenta* (CBMAI 1583) on Different Hydrophobic Supports: Modulation of Functional Properties. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 339, 2017. ISSN 1420-3049.

TURATI, D. F. M. **Purificação, imobilização e caracterização bioquímica de lipase produzida por *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583 em cultivo submerso**. 2015. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2015.

UGUR, A. *et al.* New Lipase for Biodiesel Production: Partial Purification and Characterization of LipSB 25-4. **ISRN biochemistry**, v. 2014, p. 289749, 2014. ISSN 2090-7729.

UPRETY, B. K. *et al.* Utilization of microbial oil obtained from crude glycerol for the production of polyol and its subsequent conversion to polyurethane foams. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 309-315, 2017. ISSN 0960-8524.

URRUTIA, P. *et al.* Immobilization of lipases in hydrophobic chitosan for selective hydrolysis of fish oil: The impact of support functionalization on lipase activity, selectivity and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 674-686, 2018. ISSN 0141-8130.

VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 9-18, 2013. ISSN 1087-1845.

VEERARAGAVAN, K. *et al.* Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1044, n. 1, p. 26-33, 1990. ISSN 0005-2760.

VIEIRA, G. A. B. *et al.* Chemoenzymatic synthesis of optically active Mugetanol isomers: use of lipases and oxidoreductases in fragrance chemistry. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n. 2, p. 214-219, 2009. ISSN 0957-4166.

VIEIRA, M. F. *et al.* β -Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1, p. 47-53, 2011. ISSN 1381-1177.

VIVEK, N. *et al.* Recent advances in the production of value added chemicals and lipids utilizing biodiesel industry generated crude glycerol as a substrate - Metabolic aspects, challenges and possibilities: An overview. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 507-517, 2017. ISSN 0960-8524.

VOLPATO, G. *et al.* Single-step purification of different lipases from *Staphylococcus warneri*. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 4, p. 473-478, 2010. ISSN 0021-9673.

VOLPATO, G. *et al.* Production of organic solvent tolerant lipase by *Staphylococcus caseolyticus* EX17 using raw glycerol as substrate. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 6, p. 821-828, 2008.

WANG, C.-S.; SMITH, R. L. Lowry determination of protein in the presence of Triton X-100. **Analytical Biochemistry**, v. 63, n. 2, p. 414-417, 1975. ISSN 0003-2697.

WANG, Y. *et al.* High-level expression and characterization of solvent-tolerant lipase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2017. ISSN 1389-1723.

WATANABE, M. *et al.* Xylanase (GH11) from *Acremonium cellulolyticus*: homologous expression and characterization. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 27, 2014. ISSN 2191-0855.

WON, K. *et al.* Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2149-2154, 2005. ISSN 1359-5113.

WONGWATANAPAIBOON, J. *et al.* Cloning, expression, and characterization of *Aureobasidium melanogenum* lipase in *Pichia pastoris*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 80, n. 11, p. 2231-2240, 2016. ISSN 0916-8451.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 213-219, 2007. ISSN 0958-1669.

ZARE, A. *et al.* *Candida rugosa* lipase immobilization on various chemically modified Chromium terephthalate MIL-101. **Journal of Molecular Liquids**, v. 254, p. 137-144, 2018. ISSN 0167-7322.

ZHANG, S. *et al.* Immobilization of lipase using alginate hydrogel beads and enzymatic evaluation in hydrolysis of *p*-Nitrophenol butyrate. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 34, n. 9, p. 2741-2746, 2013. ISSN 0253-2964.

ZHANG, Y. *et al.* Purification and characterization of a novel organic solvent-tolerant and cold-adapted lipase from *Psychrobacter* sp. ZY124. **Extremophiles**, v. 22, n. 2, p. 287-300, 2018. ISSN 1433-4909.

ZHENG, M.-M. *et al.* Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 141-146, 2012. ISSN 0960-8524.

ZHOU, J.-J. *et al.* Selection and characterization of an anaerobic microbial consortium with high adaptation to crude glycerol for 1,3-propanediol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 15, p. 5985-5996, 2017. ISSN 1432-0614.