

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**JULIA LINS LOPES**

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LIPASES PELA LEVEDURA *Moesziomyces*  
*aphidis* EM FERMENTAÇÃO LÍQUIDA (FL)**

MACEIÓ - AL

2023

JULIA LINS LOPES

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPASE OBTIDA POR FERMENTAÇÃO  
LÍQUIDA (FL) DA LEVEDURA *Moesziomyces aphidis***

Trabalho de Conclusão de Curso, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia pela Universidade Federal de Alagoas.

Orientador: Prof.º Dr.º Hugo Juarez Vieira  
Pereira

Coorientadora: Dr.ª Alessandra Nascimento  
Ferreira

MACEIÓ – AL

2023

**Catálogo na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

L864p Lopes, Julia Lins.  
Produção e purificação de lipase obtida por fermentação líquida (FL) da levedura  
*Moesziomyces aphidis* / Julia Lins Lopes. – 2023.  
45 f. : il.

Orientador: Hugo Juarez Vieira Pereira.  
Coorientadora: Alessandra Nascimento Ferreira.  
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) – Universidade  
Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 41-45.

1. Lipase - Purificação. 2. Fermentação. 3. *Moesziomyces aphidis*. I. Título.

CDU: 663.14

Julia Lins Lopes

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LIPASES PELA LEVEDURA *Moesziomyces  
aphidis* EM FERMENTAÇÃO LÍQUIDA (FL)

Trabalho de Conclusão de  
Curso, como requisito parcial  
para obtenção do grau de  
Bacharel em Farmácia da  
Universidade Federal de  
Alagoas – UFAL.

Data de Aprovação:

**Banca Examinadora**

Documento assinado digitalmente  
 HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA  
Data: 05/04/2023 14:53:13-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira  
Instituto de Química e Biotecnologia-UFAL  
Orientador

Documento assinado digitalmente  
 LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO  
Data: 05/04/2023 16:08:04-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo  
Instituto de Ciências Farmacêuticas-UFAL  
Examinador

Documento assinado digitalmente  
 CLEDSON BARROS DE SOUZA  
Data: 05/04/2023 15:03:01-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Cledson Barros de Souza  
Instituto de Química e Biotecnologia-UFAL  
Examinador

Dedico esse trabalho aos meus pais, Socorro Lins e Jacó Lopes, que sempre priorizaram eu e meus irmãos em suas vidas; e aos meus sobrinhos, Pedro, Alice e Bonner (pet) que são minhas alegrias.

## AGRADECIMENTOS

Fazer graduação em uma cidade que não é a sua não é fácil então começo agradecendo a mim mesma por nunca ter desistido desse sonho e por sempre ter perseverado diante das diversidades. Agradeço a Deus e a Santa Mãe por toda força e por sempre me mostrar que seria possível continuar.

Agradeço a minha mãe, Socorro Lins, por ser minha maior incentivadora, por todo seu amor, companheirismo, cuidado e orações. O seu amor é minha força. Ao meu pai, Jacó Lopes, por sua contribuição na minha educação, sem ele não seria possível estar concluindo esse trabalho. As minhas irmãs Suele, Camila e ao meu irmão Johnathan por toda a torcida para que eu realizasse meus sonhos e conquistas, por todos os momentos compartilhados não só durante a graduação, mas durante minha vida. Sem eles eu não sou. Aos meus pequenos sobrinhos Pedro e Alice, por todo amor, carinho e felicidade genuína mesmo eu distante. Nossa relação foi construída com muito amor e saudade.

O meu muito obrigada a minha tia Lila, tio Paulo, meus primos Murilo e Felipe por todo o suporte para que eu conseguisse ir morar em Maceió para começar cursar a graduação. Sem isso não teria conseguido.

Aos meus amigos do Laboratório de Metabolômica e Proteômica (LAMP) por todo o aprendizado, conhecimento e ensinamentos repassados. Eles me ensinaram como se deve trabalhar em um laboratório, como ter paciência na pesquisa e como perseverar para ter resultados. São o melhor grupo de trabalho. A Alexandra (Alê) por tudo que me ensinou, que não foi pouco, por toda dedicação para comigo, por me permitir trabalhar junto a ela em sua pesquisa. Minha eterna gratidão.

Ao professor Hugo Juarez por toda compreensão, ensinamentos, orientação e por sempre ter respostas para minhas dúvidas. É um exemplo de profissional a ser seguido. A Universidade e seus alunos com certeza ganham muito com sua dedicação e profissionalismo.

Por fim, agradeço a Universidade Federal de Alagoas por ser minha segunda casa durante esses anos, ao Instituto de Ciências Farmacêuticas e ao Instituto de Química e Biotecnologia por toda experiência de vida adquirida. A universidade tem o

poder de mudar a história dos seus alunos e isso é encantador. Aos meus professores e mestres o meu muito obrigada por tudo. Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica que me permitiu fazer pesquisa e me dedicar para que o trabalho fosse realizado, foi muito importante em minha graduação e para minha formação.

É justo que muito custe, o que muito vale.

- Santa Teresa d'Ávila

## RESUMO

O mercado das enzimas tem ganhado cada vez mais destaque na produção industrial. Enzimas existem e são importantes no metabolismo de todos os seres vivos. Considerando as lipases, que são capazes de catalisar a hidrólise de lipídeos que são apresentados em diferentes fontes, tornando-a uma alternativa promissora para indústria alimentícia, farmacêutica, química, entre outras. Diante disso, objetivou-se com esse trabalho a produção de lipases pela levedura *Moesziomyces aphidis* em fermentação líquida (FL). O perfil de produção enzimática de lipase por FL foi avaliado em resíduos de baixo custo: Óleo de fritura residual (OFR), Extrato de levedura (E) e Polpa de coco verde (PC). A levedura *Moesziomyces aphidis* BRT57 faz parte da micoteca do Laboratório de Diversidade Molecular (LDM) do ICBS/UFAL e foram isoladas de folhas de bromélias, na reserva Tocaia, no município de Santana do Ipanema-AL. A levedura foi previamente testada quanto a produção de lipases através da hidrólise do substrato tributirina em placa de Petri. A composição da fermentação líquida para seleção da melhor levedura e melhor indutor foram óleo de fritura residual, óleo de fritura residual e extrato de levedura, polpa de coco verde e polpa de coco verde e extrato de levedura. O tempo de produção foi observado até 72 h, sendo a cada 24 h alíquotas retiradas para verificar a atividade enzimática. A purificação da lipase foi feita através dos processos de fracionamento salino, cromatografia de exclusão molecular e eletroforese (SDS-PAGE). O estudo demonstrou a viabilidade da produção de lipase em fermentação líquida produzidos por leveduras de *Moesziomyces aphidis*.

**Palavras-chave:** Lipase; purificação; fermentação líquida; *Moesziomyces aphidis*.

## ABSTRACT

The enzyme market has gained increasing prominence in industrial production. Enzymes exist and are important in the metabolism of all living beings. Considering the lipases, which are able to catalyze the hydrolysis of lipids that are presented in different sources, making it a promising alternative for the food, pharmaceutical, chemical industry, among others. Therefore, the objective of this work was the production of lipases by the yeast *Moesziomyces aphidis* in liquid fermentation (FL). The enzymatic production profile of lipase by FL was evaluated in low cost residues: Residual frying oil (OFR), Yeast extract (E) and Green coconut pulp (PC). The yeast *Moesziomyces aphidis* BRT57 is part of the collection of the Molecular Diversity Laboratory (LDM) at ICBS/UFAL and was isolated from bromeliad leaves, in the Tocaia reserve, in the municipality of Santana do Ipanema-AL. The yeast was previously tested for the production of lipases through the hydrolysis of the tributyrin substrate in a Petri dish. The liquid fermentation composition for selection of the best yeast and best inducer were residual frying oil, residual frying oil and yeast extract, green coconut pulp and green coconut pulp and yeast extract. The production time was observed for up to 72 h, with aliquots withdrawn every 24 h to verify the enzymatic activity. The purification of the lipase was performed using saline fractionation, molecular exclusion chromatography and electrophoresis (SDS-PAGE) processes. The study demonstrated the viability of lipase production in liquid fermentation produced by *Moesziomyces aphidis* yeasts.

**Keywords:** Lipase; purification; liquid fermentation; *Moesziomyces aphidis*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coco verde com 7 meses de idade, considerado pronto para uso.....	17
Figura 2 - Esquema da hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases. Adaptado de HARALDSSON, 1991. ....	19
Figura 3 - Fermentação líquida para produção de lipases pela levedura <i>Moesziomyces aphidis</i> .....	26
Figura 4 - Produção de lipases pela levedura <i>Moesziomyces aphidis</i> em fermentação líquida.....	30
Figura 5 - Estudo do tempo de produção de lipases pela levedura <i>Moesziomyces aphidis</i> .	33
Figura 6 - Etapas da purificação da lipase de <i>Moesziomyces aphidis</i> .....	34
Figura 7 - Cromatograma da purificação da lipase da levedura <i>Moesziomyces aphidis</i> , por cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100.....	36
Figura 8 - Eletroforese SDS-PAGE da purificação da lipase da levedura <i>Moesziomyces aphidis</i> .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍGLAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbancia
AE	Atividade enzimática
EEB	Extrato enzimático bruto
OFE	Óleo de fritura residual e extrato de levedura
OFR	Óleo de fritura residual
PC	Polpa de coco verde
PCE	Polpa de coco verde e extrato de levedura.
p-NP	p-nitrofenol
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
Vt	Volume total
FTIR	espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
<b>2.1 Resíduos agroindustriais</b> .....	15
<b>2.1 Cocos nucifera L.</b> .....	16
<b>2.2 Óleo de fritura residual</b> .....	17
<b>2.3 Lipases</b> .....	18
<b>2.4 Fermentação líquida (FL)</b> .....	19
<b>2.5 Levedura <i>Moesziomyces aphidis</i></b> .....	20
<b>2.6 Aplicação biotecnológica de lipases</b> .....	21
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	24
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	24
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	24
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	25
<b>4.1 Microrganismo</b> .....	25
<b>4.2 Preparo do inóculo</b> .....	25
<b>4.3 Fermentação líquida (FL)</b> .....	25
<b>4.4 Determinação da atividade de lipase</b> .....	27
<b>4.5 Purificação da lipase da levedura <i>Moesziomyces aphidis</i></b> .....	28
<b>4.6 Fracionamento salino</b> .....	28
<b>4.7 Cromatografia de exclusão molecular</b> .....	29
<b>4.8 Eletroforese (SDS-PAGE)</b> .....	29
<b>5 RESULTADOS DE DISCURSÕES</b> .....	30
<b>5.1 Produção de lipases pela levedura <i>Moesziomyces aphidis</i> em fermentação líquida</b> .....	30
<b>5.2 Purificação da lipase da levedura <i>Moesziomyces aphidis</i></b> .....	34
<b>5.2.1 Fracionamento salino</b> .....	34
<b>5.2.2 Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100</b> .....	36
<b>5.2.3 Eletroforese SDS-PAGE</b> .....	37
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	40
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41

## 1 INTRODUÇÃO

Uma maior compreensão sobre enzimas possibilitou que elas fossem reconhecidas como uma boa alternativa de investimento a nível industrial de áreas diversas. Nesse trabalho abordaremos sua aplicação nas indústrias de biodiesel, alimentícia, industrial de papel e celulose e de detergentes, porém, o mercado da aplicação de enzimas em diversas áreas tem crescido a nível mundial por suas vantagens econômicas e de aplicabilidade.

A área do mercado industrial enzimático está dividida em diversas aplicações específicas. Existe espaço para enzimas de aplicação para ração animal, enzimas técnicas e enzimas para indústria de alimentos, mas também existe uma área de enzimas especiais que são aplicadas na pesquisa, diagnósticos e na química quiral da indústria farmacêutica (REVISTA PROCESSOS QUÍMICOS / SENAI, 2009).

A agricultura é uma das atividades mais importantes e antigas da humanidade. Levando em conta o crescimento populacional e o avanço da indústria de alimentos, novos problemas começaram a aparecer como exemplo o volume dos resíduos agroindustriais gerados (Saath, K. C. de O., & Fachinello, A. L. 2018). Porém esses tipos de resíduos agrícolas são ótimas fontes de carbono, ideal para o crescimento fúngico, isso acontece devido a secreção de enzimas lignocelulolíticas pelas hifas que por sua vez hidrolisam o substrato e fornecem os açúcares necessários para a sustentação do crescimento microbiano (ELISASHVILI et al., 2008).

A fonte desses resíduos é diversa, como na produção de açúcar e álcool, alimentos no geral, indústria do coco e de madeira. Segundo Celso Oliveira (2022) da ABIB Brasil, o Brasil tem um quantitativo de resíduos produzidos pelo setor agroindustrial de 967.005.044 (mil ton/ano), ainda a mesma fonte ressalta que, o potencial de energia primária dos resíduos agrícolas na projeção para 2030 requer investimentos para o desenvolvimento de rotas tecnológicas para seu reaproveitamento.

Enzimas são produzidas por processos de fermentação submersa e a fermentação semi-sólida, sistemas amplamente utilizados (Sankaralingam et al., 2012). O cultivo de microrganismo nessa técnica é feito em meio a nutrientes necessários para seu crescimento e para produção de enzimas. As vantagens são

maior homogeneidade do meio, controle e supervisão de variáveis como temperatura e pH (GEOFFRY e ACHUR, 2018).

Entre o gênero *Moesziomyces*, *M. antarcticus*, (anteriormente conhecido como *Pseudozyma antarctica* e *Candida antarctica*), produziu lipases extracelulares relevantes para a indústria, que foram expressas de forma heteróloga em diferentes hospedeiros e comercializados (FARIA et al., 2019). *Moesziomyces aphidis* (sin. *Pseudozyma aphidis*) é uma levedura ambiental comumente isolada de folhas de plantas, flores e solo. Pertence ao filo *Basidiomycota*, subfilo *Ustilaginomycota*, classe *Ustilaginomycetes* e ordem *Ustilaginales* (MPAKOSI et al., 2022).

Esse estudo tem como proposta a produção de lipases pela levedura *Moesziomyces aphidis* isolada de folhas de bromélias do estado de Alagoas, em fermentação líquida (FL) utilizando meios de custo baixo, o que o torna uma boa alternativa de aproveitamento e obtenção de enzimas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Resíduos agroindustriais

A agricultura é uma das atividades mais importantes e antigas da humanidade. Levando em conta o crescimento populacional e o avanço da indústria de alimentos, novos problemas começaram a aparecer como exemplo o volume dos resíduos agroindustriais gerados. Economicamente a manufatura agropecuária de um país tem grande capacidade de gerar renda com sua rápida expansão na produção e desenvolvimento, porém esse crescimento acaba gerando problemas a serem levados em consideração e tratado com preocupação (ARIEIRA, J. O., 2017).

Com a crescente produção em diversas áreas de resíduos gerados pela população e a preocupação com o meio ambiente, a ABNT criou a CEET-00.01.34 - Comissão de Estudo Especial Temporária de Resíduos Sólidos, para revisar a ABNT NBR 10004:1987, norma em que classifica os tipos de resíduos existentes como:

Resíduos nos estados sólido e semi-sólido, que resultam de atividades da comunidade de origem: industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviço e de varrição. Ficam incluídos nesta definição os lodos provenientes de sistemas de tratamento de água, aqueles gerados em equipamentos e instalações de controle de poluição, bem como determinados líquidos cujas particularidades torne inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou corpos de água, ou exijam, para isso, soluções técnicas e economicamente inviáveis em face a melhor tecnologia disponível. (ABNT NBR 10004, 2004, p. 1)

A composição principal dos resíduos agroindustriais são polímeros de carboidratos como amido; celulose e hemicelulose; proteínas; lipídios; fibras e outras matérias orgânicas (Nascimento & Alencar, et al., 2020). Levando em conta que os principais resíduos gerados pela agroindústria Brasileira são resíduos sólidos, como fibra de coco, casca de arroz, farelo de trigo entre outros, o seu valor nutritivo deve ser considerado. Gil, E.S. et al., (2007) ressalta que esses resíduos possuem compostos bioativos com potencial para as indústrias farmacêutica, química e alimentícia, e que são possíveis de produção em meios de baixo custo, alternativa sustentável.

Existe grande disponibilidade de biomassa lignocelulósica no nosso país e no mundo sendo extraídas de resíduos agroindustriais, por exemplo. É um tipo de matéria-prima de processamento complexo com até 75% de celulose e hemiceluloses.

Sendo constituído por lignina, hemicelulose e celulose (Cardona, C. A., Quintero, J. A., Paz, I. C., 2010).

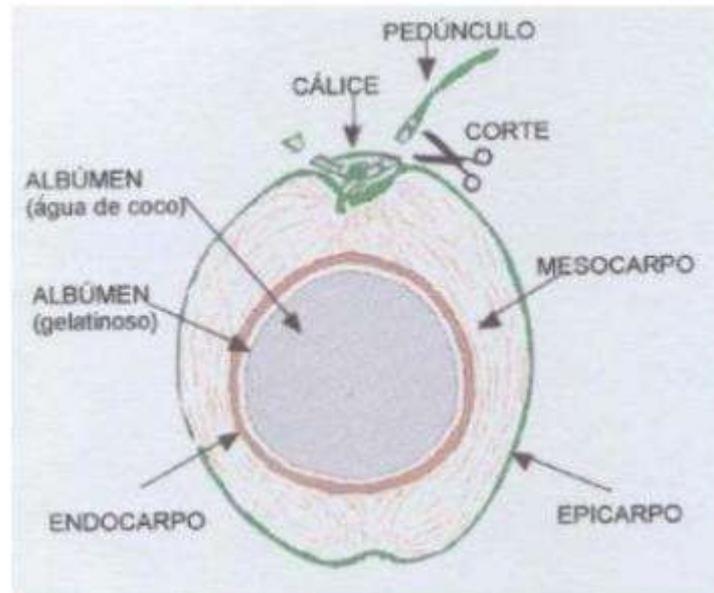
## **2.1 Cocos *nucifera* L.**

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira perene monóica da família *Arecaceae* (BEVERIDGE, F.C, KALAIPIANDIAN, S., 2022, YANG & ADKINS 2022). No Brasil que é um país de coco, espera-se que sejam descartados cerca de sete milhões de toneladas de cascas de coco por ano. A cocoicultura instalada no Brasil foi uma forma de aproveitamento das inúmeras possibilidades que a casca descartada oferta como por exemplo, produção de palets para móveis, biocombustível verde, carvão vegetal entre outros. Resultando em uma considerável geração de emprego e renda no nosso país (MANUEL ALBERTO GUTIÉRREZ CUENCA, 2016).

A poupa do coco tem valor nutricional com propriedades benéficas para seu aproveitamento. A quantidade calculada para cerca de 100 gramas de polpa é de 09 g de fibras também é fonte de gordura, vitaminas B1, B2, B6 e C e de minerais como potássio, cálcio, sódio, ferro e fósforo (ABESO, BRASIL). Segundo Grapiúna (2012), a composição do coco é de 65% do coco corresponde à noz e seu conteúdo (albúmen sólido e água) e 35% restantes correspondem à parte fibrosa (casca), sendo o mesocarpo material rico em lignina, celulose e hemicelulose, uma rica oferta de material lignocelulósico. Entre 6-7 meses do seu desenvolvimento, a medula do coco contém uma quantidade substancial de extrativos, sendo considerado pronto para uso como mostra a Figura 1.

Considerando que o coco é uma fruta grande que ultrapassa 1 kg de peso e grande parte dele é descartado, já que o epicarpo, mesocarpo e endocarpo não são comestíveis. Gerando grande quantidade de resíduos principalmente em cidades litorâneas em que seu consumo é aumentado, sendo considerado um problema no volume de desperdício (Esmeraldo et al., 2010).

Figura 1 - Coco verde com 7 meses de idade, considerado pronto para uso.



Fonte: Assis et al., 2000.

## 2.2 Óleo residual de fritura

Esse tipo de material pode se tornar um poluente ambiental se descartado incorretamente se tornando um potencial poluidor de águas. No Brasil esse tipo de resíduo é reaproveitado na produção de sabão, cola e tinta por exemplo, mas levando em consideração a grande quantidade produzida para descarte no país a sua reutilização ganhou uma maior escala, que foi a produção de biocombustível. Óleos vegetais são produtos naturais formados principalmente por triglicerídeos. O Brasil se produz aproximadamente quatro bilhões de litros de óleo de fritura por ano, sendo que dois bilhões são descartados. A reciclagem desses resíduos vem ganhando espaço cada vez maior (BARBOSA, G. N.; PASQUALETTO, A., 2008).

A estrutura química do óleo de fritura residual avaliadas usando espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) são correspondentes aos ácidos carboxílicos (O-H); correspondendo a carbonila (C=O); a alcanos (CH<sub>2</sub>); alcanos (CH<sub>3</sub>); alquil cetona (C-N); polissacarídeo (C-O-C); ésteres (C-C); carboidrato (C-O). O óleo de fritura residual não possui picos de absorção próximos a 800 cm<sup>-1</sup> ou 1588 cm<sup>-1</sup>, que representam as bandas do benzeno (BILEMA, M. et al., 2021).

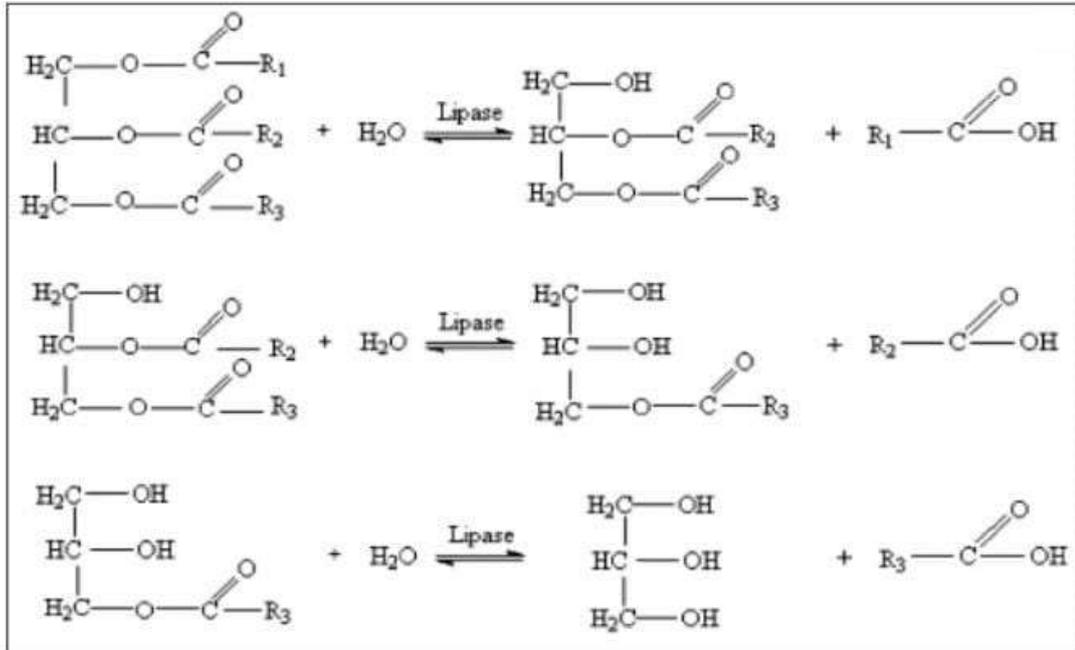
## 2.3 Lipases

Existem enzimas microbianas, fúngicas, derivadas de plantas e animais sendo cada tipo com uma forma diferente de extração e em meios que favorecem seu crescimento. Enzimas fúngicas e microbianas são consideradas mais proveitosas por a disponibilidade catalítica ofertada, melhor forma de manipulação genética e rápido crescimento em meios de baixo custo, como em resíduos agroindustriais por exemplo (Wiseman A., 1995).

Lipases são enzimas que atuam sobre lipídios atuando como catalisadores biológicos pertencentes à família das hidrolases (glicerol éster hidrolases E. C. 3.1.1.3) que tem como função primordial catalisar a hidrólise de óleos e gorduras liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (JAEGER, 1998). Em meio aquoso a reação catalisada pelas lipases é hidrólise de éster, que é a reação de uma molécula de água e um éster. É feita via hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, essa mistura resulta em triglicerídeo, água, glicerol e ácidos graxos, diacilgliceróis e monoacilgliceróis (Castro, H. F., et al.,2004), esquema da Figura 2.

As lipases microbianas podem ser produzidas por fermentação líquida (FL), é uma técnica de cultivo de micro-organismos em meio líquido com nutrientes necessários para o crescimento do micro-organismo e produção de enzimas, geralmente sob agitação. Esse sistema apresenta vantagens como maior homogeneidade do meio, facilidade de controle e monitoramento das variáveis como temperatura e pH. Essas condições promovem a aplicação em grande escala (GEOFFRY e ACHUR, 2018).

Figura 2 - Esquema da hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases. Adaptado de HARALDSSON, 1991.



As lipases são capazes de hidrolisar proteínas insolúveis em água. São conhecidas por terem várias funções fisiológicas. Em eucariotos, são produzidos no sistema digestivo para hidrolisar os triglicerídeos absorvidos. Sua produção seria ativada por um sistema de regulação sensível a hormônios quando a demanda de energia aumenta, iniciando assim a degradação da reserva triglicerídeos. Nas plantas, as lipases estão localizadas principalmente nas sementes, como parte da reserva de energia tecidos, e realizar a hidrólise dos triglicerídeos de reserva necessários para o crescimento pós-germinativo. Os microrganismos usam a produção de extracelulares de lipases para hidrolisar os triglicerídeos no meio e facilitar a ingestão de lipídios (CASAS-GODOY, L., et al., 2018).

## 2.4 Fermentação líquida (FL)

A fermentação líquida é um método eficiente e ecológico, por isso tem atraído atenção para ser a primeira escolha de muitos trabalhos de produção em grande escala. Essa escolha de fermentação é feita industrialmente para produção a grande

escala de enzimas para uso agrícola e para outros tipos de aplicação. Esse método é escolhido por sua prática já ser consolidada, tornando a funcionalidade mais passível de acertos e a influência do monitoramento do cultivo controlado (Allbiom – empresa de inteligência em processos, 2020).

Por se tratar de uma técnica já consolidada no mercado nas últimas décadas e por ainda ser muito utilizada em importantes áreas em sua produção, a fermentação líquida é empregada no processo de fabricação enzimática para aplicabilidade em indústrias farmacêuticas, alimentícia, têxtil, bioquímica e além (PANDEY, 2003). A fermentação em substrato sólido corresponde perfeitamente ao sistema de fermentação submersa, onde sua funcionalidade é a multiplicação de microrganismo em meio líquido, na grande parte dos procedimentos em agitação mecânica, com alto teor de água sendo fornecido (MAGANHOTO, N.H, 2020).

As fases de fermentação de o crescimento e a produção de esporos podem ser reguladas de forma diferente Parâmetros passíveis de controle no sistema de fermentação submersa são de grande vantagem para sua aplicabilidade, são aplicadas diferentes formas de regulação para esses tipos de controle. Regulação de pH, temperatura, oxigenação, relação C:N e menor risco de contaminação contribuem também, para o êxito de uma produção de esporos resistentes (Mascarin et al., 2015).

Esse tipo de fermentação vem sendo considerada a alternativa promissora pelas indústrias pelas vantagens que ela oferta como redução de tempo de cultivo do microrganismo, controle de nutrientes do meio, controle de vitaminas, sais, fonte de carbono e nitrogênio, aumentando com isso ganho econômico e no tempo de produção. Outra dinamicidade em sua manipulação é a sua facilidade e flexibilidade durante o controle do processo fermentativo como também é um bom método de obtenção de blastosporos de fungos (JACKSON, M. A. et al., 2010). Muitos outros trabalhos têm sido publicados nesta área, principalmente em relação à composição do meio líquido. Entretanto poucos são os estudos atuais em relação a estes meios para o desenvolvimento de *Moesziomyces aphidis*.

## **2.5 Levedura *Moesziomyces aphidis***

O gênero *Moesziomyces* é monofilético e as estruturas de suas leveduras são de reprodução assexuadas anamórficas que pertencem ao filo Basidiomycota e a ordem Ustilaginales (KRUSE et al., 2017). Na América Latina, o primeiro relato de *P.*

*aphidis* foi no Brasil, a presença relatada desta espécie foi através da identificação molecular da região D1/D2 do 26S rDNA, em solo semiárido de Município de Mucugê, Bahia (ROQUE, N. et al., 2016). *Moesziomyces aphidis* (sin. *Pseudozyma aphidis*) é uma levedura ambiental comumente isolada de folhas de plantas, flores e solo.

Araújo, C. C. (2016) fez um estudo da família Bromeliaceae Juss no país e em sua coleta de dados no Estado de Alagoas são ou já foram encontradas as seguintes espécies: *Ananas bracteatus* (Lindl.), *Tillandsia recurvata* L., *Tillandsia streptocarpa*, *Tillandsia stricta* Sol., *Tillandsia tenuifolia* L.

As bromélias de tanques epífitas, membros da diversa família *Bromeliaceae*, são plantas onipresentes na maior parte dos Neotrópicos, tanto em ambientes naturais quanto agrícolas (Toledo-Aceves et al. 2012). A bromélia é da família da *Bromeliaceae* Juss, monocotiledôneas pertencente à ordem dos Poales. Fontes do BFC (2015), o Brasil é um país com grande diversidade, já foram registrados até o ano pesquisado, 44 gêneros e 1.343 espécies, e destas, 87,4% são consideradas endêmicas do país.

## 2.6 Aplicação biotecnológica de lipases

A otimização dos parâmetros do bioprocesso aumentou a produção de lipase. Além disso, as lipases microbianas ganharam atenção intensificada para uma ampla gama de aplicações nas indústrias de alimentos, detergentes e cosméticos, bem como na biorremediação ambiental (Adegoke Isiaka Adetunji e Ademola Olufolahan Olaniran, 2021). As lipases microbianas constituem uma importante classe de enzimas biotecnologicamente valiosas, principalmente devido à sua versatilidade em termos de propriedades enzimáticas e especificidade de substrato. Esses recursos tornam as lipases a enzima de escolha para várias aplicações nas indústrias de alimentos, detergentes, couro, farmacêutica, têxtil, cosmética e de papel, etc. (Hassan F. et al, 2006)

Há uma grande demanda para a transição dos químicos para os biológicos catalisadores que potencializam processos verdes, envolvendo a utilização de bioprodutos. O interesse continuamente crescente em lipases decorre de sua adaptabilidade biotecnológica e capacidade de catalisar uma ampla variedade de reações de bioconversão em diferentes campos (A.R. Ismail et al, 2017). A alta demanda da aplicação das lipases microbianas e fúngicas e o crescente estudos delas é uma alternativa cada vez mais procurada industrialmente.

Os procedimentos de transesterificação catalisada por lipase da produção de biodiesel têm várias vantagens sobre os procedimentos quimicamente catalisados, como sem reações colaterais, condições de reação suaves e a flexibilidade de trocar triglicerídeos por ácidos graxos livres. Além disso, outras vantagens, tais como etapas de separação simples, fluxo a jusante mínimo negociações e recaptura de glicerol eficaz tornam o processo atraente para produção de biodiesel (M. Shahedi et al, 2021). Refletindo sobre a aplicação da lipase no biodiesel, Christopher LP, Kumar H, Zambare VP (2014) reporta que a rota enzimática usando lipases é uma rota alternativa ambientalmente sustentável para a síntese de biodiesel.

O biodiesel e o glicerol são produzidos em formas mais puras, e a geração de águas residuais de lavagem é evitada. No entanto, o processo enzimático também tem desvantagens significativas em relação ao processo químico: tem uma produtividade menor, e os custos da enzima são bastante altos. É, portanto, essencial diminuir os custos da enzima encontrando novas enzimas que tenham alta atividade e estabilidade em meio orgânico, permitindo sua reutilização em ciclos repetidos (PALOMINIO-ROMERO, J. A. et al., 2012).

As lipases são parte integrante da indústria alimentícia moderna. hoje em dia, as enzimas industriais, especialmente as lipases, são comumente usadas na produção de uma variedade de produtos, desde sucos de frutas, alimentos assados e fermentação de vegetais até enriquecimento de laticínios (Mcgee, 1986; Zalacain et al; 1995). O objetivo do século 21 na indústria nutracêutica é produzir produtos sensíveis ao custo em quantidade abundante por meio de uma produção ecologicamente responsável.

As lipases são empregadas na indústria de celulose e papel para a remoção de piche (um componente hidrofóbico da madeira), o que cria sérios problemas na fábrica de papel, produzindo depósitos de cola nas máquinas de papel e causando manchas nos produtos de papel acabados. Isso é obtido pela hidrólise de triglicerídeos no piche em monoglicerídeos, glicerol e ácidos graxos, que são menos pegajosos e altamente hidrofílicos (OLIVEIRA, A.L.A., et al, 1999).

Importante na hidrólise de óleos e gorduras, a incorporação da lipase a detergentes, que são usados principalmente em lavanderias industriais e lava-louças domésticas para remover manchas contendo gordura (Jaeger K, Reetz MT 1998). Levando em conta que o descarte inadequado de óleo prejudica estações de tratamento de esgoto e galerias de águas pluviais tornando o tratamento com custos

mais elevados. Um estudo de Horchani H. et al., (2012) ressalta que, os requisitos para aplicação de lipase em indústrias de detergentes podem incluir alta especificidade de substrato, atividade e estabilidade em pH alcalino e temperaturas acima de 40°C, e compatibilidade com diferentes componentes em um detergente, incluindo íons metálicos, surfactantes, oxidantes e proteases.

Os benefícios para a aplicabilidade enzimática a nível industrial são inúmeros. Com o avanço do segmento e resses estudos nessa área, novas enzimas são projetadas com melhorias em sua estabilidade, atividade catalítica e maior custo-benefício. A introdução da nova geração de enzimas baratas e muito termoestáveis pode mudar o equilíbrio econômico no rumo do uso da lipase (NEOPROSPECTA, 2022).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Este trabalho tem como objetivo produzir e purificar lipase pela levedura *Moesziomyces aphidis* em fermentação líquida (FL) em meios de produção de baixo custo.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Coletar e preparar resíduos agroindustriais com o intuito de serem aplicados na produção das enzimas
- Aplicar leveduras em fermentação líquida para produção de lipases
- Selecionar a melhor levedura produtora de lipases e o melhor resíduo para ser utilizado no meio de produção
- Purificação de lipase
- Produção de lipase da levedura *Moesziomyces aphidis*

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Microrganismo

A levedura *Moesziomyces aphidis* BRT57 faz parte da micoteca do Laboratório de Diversidade Molecular (LDM) do ICBS/UFAL. Foi isolada de folhas de bromélias, na Reserva Tocaia, no município de Santana do Ipanema-AL.

### 4.2 Preparo do inóculo

Para testar previamente as leveduras *Moesziomyces aphidis* BRT57 quanto a produção de lipases, em placa de Petri, através do processo de hidrólise do substrato tributirina e Tween 80. A partir desse estoque de linhagens, foram inoculadas em meio de cultura Yeast Peptone Dextrose (YPD) sólido estéril (2% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 1% de peptona e 2% de ágar) e incubadas a 25 °C por 48 h. As colônias isoladas foram transferidas para 5 mL de meio de cultura YPD líquido (2% de glicose, 0,5% de extrato de levedura e 1% de peptona) em tubo de ensaio e foram incubados também a 25 °C por 48 h para desenvolvimento do pré-inóculo.

Então o pré-inóculo foi centrifugado a 6.000 rpm por 5 min. Foi adicionado ao precipitado 5 mL de água destilada estéril e agitado em agitador magnético, por duas vezes, para obter células precipitadas e lavadas.

Esse precipitado de células, foi diluído com água destilada estéril para ajuste da densidade celular. Foi realizada diluições seriadas até obter uma absorbância entre 0,11 e 0,15 a 530 nm em espectrofotômetro (Pró-análise -UV 1600). O procedimento fornece uma suspensão padrão de leveduras com uma concentração na faixa de  $10^6$  a  $10^7$  células mL<sup>-1</sup>.

### 4.3 Fermentação líquida (FL)

Em frascos de erlenmeyers de 100 mL contendo 50 mL de água destilada estéril, 1 % de indutor e 1 % de extrato de levedura, esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm por 15 min foram feitas as FL, como mostra a Figura 3. Inoculados com 5 mL de suspensão padrão de levedura com concentração de  $10^6$  a  $10^7$  células mL<sup>-1</sup>. Foram incubados em incubadora Shaker (Max labor) a 25 °C e 130 rpm. Ao finalizar o tempo

de produção, todo material foi centrifugado a 6.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi separado e armazenado a 4 °C, sendo este o extrato enzimático bruto (EEB).

Para selecionar a melhor levedura produtora de lipases e melhor indutor da produção da enzima, as leveduras de *M. aphidis* foi inoculada nas condições mencionadas. Os indutores testados foram a polpa de coco verde (1 %, p/v) e o óleo de fritura residual (1 %, v/v) exemplificados na Figura 3. O tempo de produção foi observado até 72 h, sendo a cada 24 h alíquotas retiradas para verificar a atividade enzimática. A composição desses meios é apresentada na Tabela 1.

Figura 3 - Fermentação líquida para produção de lipases pela levedura *Moesziomyces aphidis* realizadas em fracos de Erlenmeyer.



Fonte: FERREIRA, A. N. (2022)

Selecionando a melhor levedura produtora de lipases e o melhor indutor, após isso a produção da enzima foi avaliada em um período de 120 h, a cada 24 h alíquotas foram retiradas para dosagem da atividade enzimática. Padronizando a produção de lipase em FL, o Extrato Enzimático Bruto (EEB) foi submetido a etapas de purificação que nesse estudo são ultrafiltração, cromatografia de exclusão molecular e eletroforese (SDS-PAGE).

Tabela 1 - Composição das fermentações líquidas para seleção da melhor levedura e melhor indutor

Composição das fermentações líquidas	
OFR	Óleo de fritura residual (1 %, v/v)
OFE	Óleo de fritura residual (1 %, v/v) e extrato de levedura (1 %, p/v)
PC	Polpa do coco verde (1 %, p/v)
PCE	Polpa de coco verde (1 %, p/v) e extrato de levedura (1 %, p/v)

OFR = óleo de fritura residual, OFE = óleo de fritura residual e extrato de levedura, PC = polpa de coco verde, PCE = polpa de coco verde e extrato de levedura.

Fonte: FERREIRA, A. N. (2022)

#### 4.4 Determinação da atividade de lipase

O método espectrofotométrico de quantificação do *p*-nitrofenol (*p*-NP), após a hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) foi utilizado para determinar a atividade de lipases, segundo Ferreira et al. (2018) com adaptações. Soluções A e B foram preparadas, solução A contendo: 60 mg de *p*-NPP em 20 mL de álcool iso-propílico e solução B contendo: 4 g de Triton X-100 e 0,4 g de goma arábica em 200 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M e pH 7,0). Em microplacas para conduzir os ensaios racionais, foi adicionado 40 µL da solução A, 120 µL da solução B e 40 µL da amostra.

O branco da matriz foi preparado sem a presença do substrato e o branco total sem a presença da amostra. Posteriormente os ensaios foram incubados a 40 °C durante 1 h, sendo o *p*-NP quantificado a 410 nm em leitor Flex Station 3 (Molecular Devices, California EUA). Para hidrolisar 1 µmol min<sup>-1</sup> de *p*-NPP sob as condições de teste, uma unidade (U) de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima necessária, utilizando o coeficiente de extinção molar para o *p*-NPP ( $\epsilon_{410}$ ) de 9780 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. A atividade enzimática de lipase foi calculada conforme a equação 1. (MIRANDA et al., 2019).

Equação 1

$$AE \left( \frac{U}{L} \right) = \frac{Abs * Vt}{\epsilon * Ve * t} * D * 1000$$

Onde:

Abs: absorvância da mistura reacional (410 nm),

Vt: volume total da mistura reacional,

$\epsilon$ : coeficiente de extinção molar do *p*-NPP em pH 7,0,

$\lambda$ : 410 nm,

Ve: volume de enzima,

t: tempo de reação em minutos,

D: diluição da amostra e

1000: transformação de mol para  $\mu\text{mol}$ .

#### **4.5 Purificação da lipase da levedura *Moesziomyces aphidis***

Nessa etapa de purificação, o EEB foi submetido ao concentrador centrífugo (Corning® Spin-X® UF 500), que é composto por uma membrana com poros de 10 KDa, com capacidade máxima de 500  $\mu\text{L}$  de amostra e uma câmara de filtragem. Em quatro concentradores, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de amostra em cada concentrador e em seguida foram centrifugados a 15.000  $\times g$  e 4 °C por 20 min, a centrifugação foi repetida até que o volume de amostra na membrana fosse de 50  $\mu\text{L}$ . Ao final, a amostra concentrada foi reunida e dosada a atividade enzimática.

#### **4.6 Fracionamento salino**

O EEB foi submetido a fracionamento pela adição do sal sulfato de amônio nas concentrações 20; 40; 60 e 80% ( $\text{g mL}^{-1}$ ) (ENGLARD E SEIFTER, 1990). Na etapa de adição do sal o extrato é mantido sob agitação em banho de gelo, logo após a amostra fica em repouso por 1 h a 4 °C. Após esse descanso as amostras foram centrifugadas a 15.000  $\times g$  e 4 °C por 15 min. Para encerramento do procedimento o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M e pH 7,0) e então foi dosada a atividade enzimática de todas as frações.

#### **4.7 Cromatografia de exclusão molecular**

O cromatógrafo líquido que foi usado nesse trabalho foi o AKTA Prime Plus (GE Healthcare, Uppsala), acoplado a ele uma coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 (60 x 0,5cm) onde o extrato enzimático bruto ultrafiltrado (300 µL) foi aplicado. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl (50 mM e pH 8,0) e 0,5 M de NaCl. A cromatografia ocorreu a um fluxo de 0,1 mL min<sup>-1</sup> sendo coletada frações de 2 mL. Em cada fração foi verificada a concentração de proteína a 280 nm e a atividade enzimática.

#### **4.8 Eletroforese (SDS-PAGE)**

He, F. (2011) escreveu que a eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE) é usada para separar proteínas com massa molecular relativa não inferior a 10 KD. Proteínas muito pequenas (<10 KD) são difíceis de resolver devido à baixa capacidade de ligação ao SDS, que pode ser resolvida por géis de gradiente ou usando diferentes condições de eletroforese, como Tricine-SDS-page. O procedimento básico de LAEMMLI (1970), fala que o perfil de bandas das etapas de purificação foi verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com dodecil-sulfato de sódio (SDS).

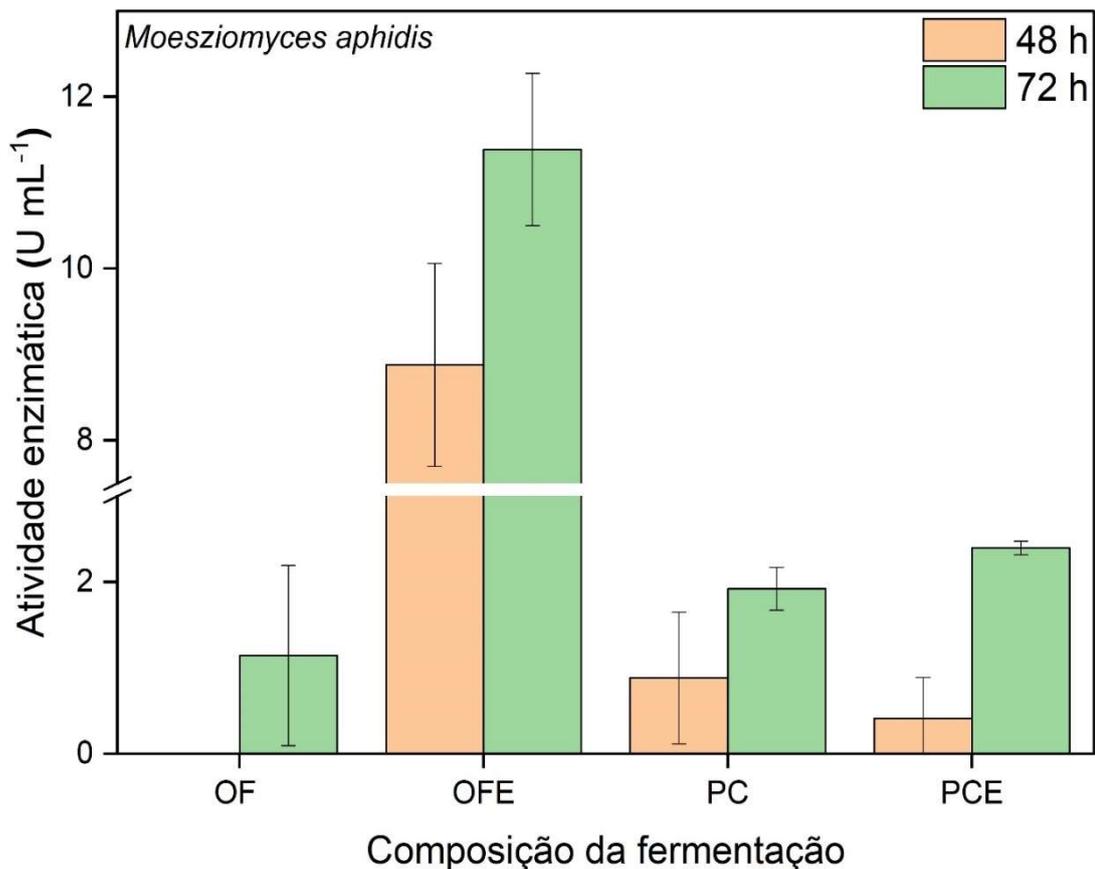
O tampão das amostras desse estudo foi composto por Tris-HCl (0,5 M e pH 6,8), SDS 2%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,001%, mantidos a 100 °C por 5 min. Os géis foram corados com nitrato de prata (SANTOS et al., 2016).

## 5 RESULTADOS DE DISCURSÕES

### 5.1 Produção de lipases pela levedura *Moesziomyces aphidis* em fermentação líquida

A levedura *M. aphidis* nas primeiras 48h produziu lipases nas fermentações enriquecidas com OFE, PC e PCE. Observando as primeiras 24h não houve produção de lipases em nenhuma das fermentações. Após 72h houve produção nas fermentações de OFR, OFE, PC, PCE, ou seja, em todas, como pode observar na Figura 4, onde o gráfico mostra os resultados das produções de lipases pela levedura *M. aphidis* em FL utilizando os meios enriquecidos desse estudo.

Figura 4 - Produção de lipases pela levedura *Moesziomyces aphidis* em fermentação líquida.



OFR = óleo de fritura residual, OFE = óleo de fritura residual e extrato de levedura, PC = polpa de coco verde, PCE = polpa de coco verde e extrato de levedura.

Fonte: FERREIRA, A. N. (2022)

Fermentações com OFE apresentaram a maior produção em 48 e 72h, as respectivas atividades enzimáticas foram de 8,88 e 11,39 U mL<sup>-1</sup>. Sendo assim a produção de lipases para as leveduras nas condições testadas. A levedura *M. aphidis* foi a melhor produtora em todas as condições e tempos de estudo.

De acordo com Haba E, Bresco O, Ferrer C et al (2000), o óleo de fritura usado é considerado um substrato interessante e barato para a produção de lipase, embora possa conter alguns compostos tóxicos. Ainda ressalta que a capacidade dos microrganismos de crescer e produzir lipases quando cultivadas em óleos de fritura representa um novo passo na minimização de resíduos. MESSIAS et al., (2009) fala que, é de grande relevância o estudo da adição de fontes de carbono (especialmente substratos hidrofóbicos) e nitrogênio em FL para produção de lipases, pois garante uma melhor produção da enzima. Segundo Ramos MJ, Fernández CM, Casas A et al (2009), o óleo de soja contém triacilgliceróis com aproximadamente 80% de gorduras insaturadas ácidos, dos quais 55% são ácido linoleico (C18:2) e 23% são o ácido oleico (C18:1). Óleos de azeitona e girassol usados em fritura também foram usados para isolar microrganismos capazes de para crescer e transformar esses óleos vegetais. Os gêneros de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus* e *Staphylococcus* foram identificados nesses óleos usados e o maior produtor de lipase foi *Pseudomonas* com atividade de 1703 U/L (Haba et al., 2000).

Lipases comercialmente disponíveis são geralmente obtidas de microrganismos que produzem uma grande variedade de lipases extracelulares. SALIHU, A. et al., (2021) ressalta que lipases comerciais foram desenvolvidas por várias empresas biomoleculares e modificações foram feitas usando diferentes técnicas para que possam ser usados como potenciais biocatalisadores com propriedades melhoradas em aplicações específicas.

Os agro-resíduos fibrosos são subprodutos de origem lignocelulósica e nutricionalmente podem ser classificados de acordo com sua digestibilidade, podem ser agrupados em de alta digestibilidade (ex: casca de soja) e de baixa digestibilidade (ex.: cana-de-açúcar, bagaço) (Graminha et al., 2008). Além do fornecimento de as exigências nutricionais dos agro-resíduos para a cultura da microbiota, eles também servem para ancorar as células. O substrato que fornece todos os nutrientes necessários para os microrganismos que crescem nele é considerado o substrato ideal. No entanto, alguns dos nutrientes podem estar disponíveis em concentrações

sub-ótimas ou mesmo ausentes em o substrato. Nesses casos, a suplementação exógena torna-se necessário (Pandey et al., 1999).

O mecanismo de produção de lipase microbiana é geralmente dependente de mecanismos regulatórios celulares induzidos pelos componentes dos substratos. Além destes, modelos estatísticos e matemáticos têm sido utilizados para aumentar a produção de lipases através dos estudos de otimização envolvendo a composição do substrato, parâmetros de fermentação e condições de cultura (SALIHU, A. et al., 2021).

Em comparação ao óleo de fritura residual a polpa do coco verde, com indutor, obteve a menor produção de lipases como mostra a Figura 4, por seu estado físico ser sólido sua emulsão mecânica é mais dificultosa do que a do óleo de fritura residual. Segundo o estudo de BRÍGIDA, A.I.S (2010), a polpa do coco verde por possuir teores de lignina e celulose na faixa de 35 a 40%, respectivamente, e metais na superfície, a fibra de coco apresenta alta resistência mecânica. Sendo assim, resíduo da agroindústria, a geração de casca de coco representa um problema sério de descarte, principalmente nos grandes centros urbanos, por ser volumoso e de degradação lenta, gera impactos ambientais significativos.

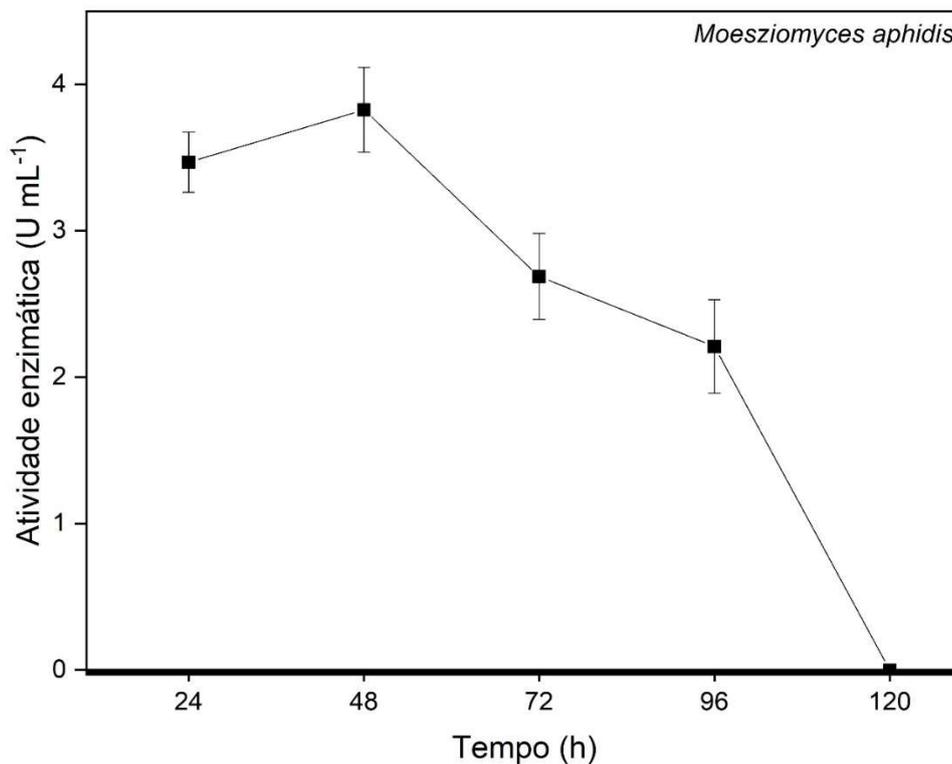
Gomes, N.B. et al. (2018) quando estudaram a produção de lipases pela levedura *Candida viswanathii* em FL avaliaram o efeito de fontes de nitrogênio orgânico, e perceberam que o extrato de levedura nutrido com azeite foi a melhor fonte de nitrogênio na produção da enzima. Um estudo feito por J.A. Rodriguez, J. A (2006) para melhorar a produção de lipase pela modificação da fonte de nutrientes usando *Rhizopus homothallicus* mostra que com uréia a atividade foi cerca de seis vezes maior do que com extrato de levedura. Um similar observação foi relatada usando *Penicillium restrictum*. Por outro lado, Lima et al. (2003) descobriu que a produção de lipase com *Penicillium aurantiogriseum* foi estimulada usando sulfato de amônio. A fibra do coco verde se apresenta como um material lignocelulósico em potencial.

Tendo em vista que a composição do meio de cultura pode afetar a produção de lipase. O óleo como fonte de carbono é um fator de grande influência na fermentação submersa e o azeite é um componente caro em qualquer meio de produção de lipase (Sethi et al., 2016). É evidente em muitos estudos que o petróleo como fonte de carbono é o principal fator de influência na produção de lipase fúngica (Bindiya e Ramana, 2014). No entanto, o papel de outros indutores na síntese de

lipase e o mecanismo geral de estimulação são pouco compreendidos (Large et al., 1999).

O presente estudo apresenta a vantagem do uso de um óleo residual como alternativa promissora para suplementar cultivos microbianos como fonte de carbono e indutor da produção de lipases. A levedura *M. aphidis* foi escolhida para produção de lipases em FL enriquecida com óleo de fritura residual e extrato de levedura (FERREIRA, A. N., 2022). Assim, a produção da enzima foi avaliada por um período maior, de 24 até 120 h, Figura 5.

Figura 5 - Estudo do tempo de produção de lipases pela levedura *Moesziomyces aphidis*



Fonte: FERREIRA, A. N. (2022)

A produção de lipases foi observada a partir de 24 h. Essa produção é aumentada em 48 h, foi o tempo de máxima produção com atividade de 3,83 U mL<sup>-1</sup>. Nos próximos tempos há um decréscimo da produção da enzima e em 120 h não houve produção (Figura 5). Diante disso, o tempo de 48 h foi estabelecido para

produção de lipases pela levedura *M. aphidis* em FL com OFE. Nos resultados anteriores, o tempo de máxima produção foi 72 h com atividade de 11,39 U mL<sup>-1</sup> (Figura 4). Provavelmente essa variação ocorreu devido a adição da etapa de pré-inóculo e lavagem das células, procedimento não usado no preparo do inóculo das FL para a seleção da levedura e da composição do meio de produção. Portanto, o pré-inóculo reduziu a fase de adaptação da levedura ao meio de produção e com isso reduziu o tempo de máxima produção da enzima, no entanto, houve uma queda na atividade quando comparado aos resultados da produção anterior (FERREIRA, A. N. 2022). A próxima etapa foi a de purificação da enzima do extrato bruto enzimático.

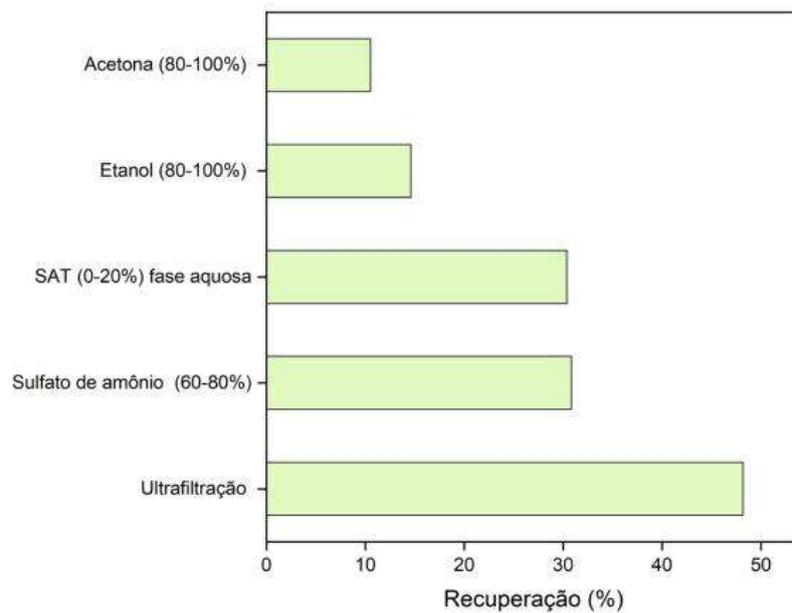
## 5.2 Purificação da lipase da levedura *Moesziomyces aphidis*

### 5.2.1 Fracionamento salino

O extrato enzimático bruto (EEB) produzido foi submetido ao fracionamento salino em diferentes frações de precipitação e apresentou atividade significativa nas seguintes frações (0-20, 60-80, 80-100%), como mostrado na figura 6.

No fracionamento salino a maior recuperação (porcentagem de enzima recuperada em relação ao extrato bruto) da enzima foi 30,8% na fração 60 - 80%. O EEB ainda foi submetido a fracionamento com solventes orgânicos (acetona e etanol), com objetivo de encontrar um método que remova os contaminantes com melhor recuperação da enzima, como mostra a figura 6. A fração com maior recuperação da enzima foi a 80 - 100% nos dois fracionamentos, 14,6% quando a enzima foi precipitada com etanol e 10,5% com acetona. Recuperações menores do que a encontrada no fracionamento salino. Em busca de uma melhor recuperação da enzima, o EEB foi aplicado em sistema aquoso trifásico (SAT). Em todos os SAT a maior recuperação da enzima foi encontrada na fase aquosa.

Figura 6 - Etapas da purificação da lipase de *Moesziomyces aphidis*



SAT = sistema aquoso trifásico.

**Fonte:** FERREIRA, A. N. (2022)

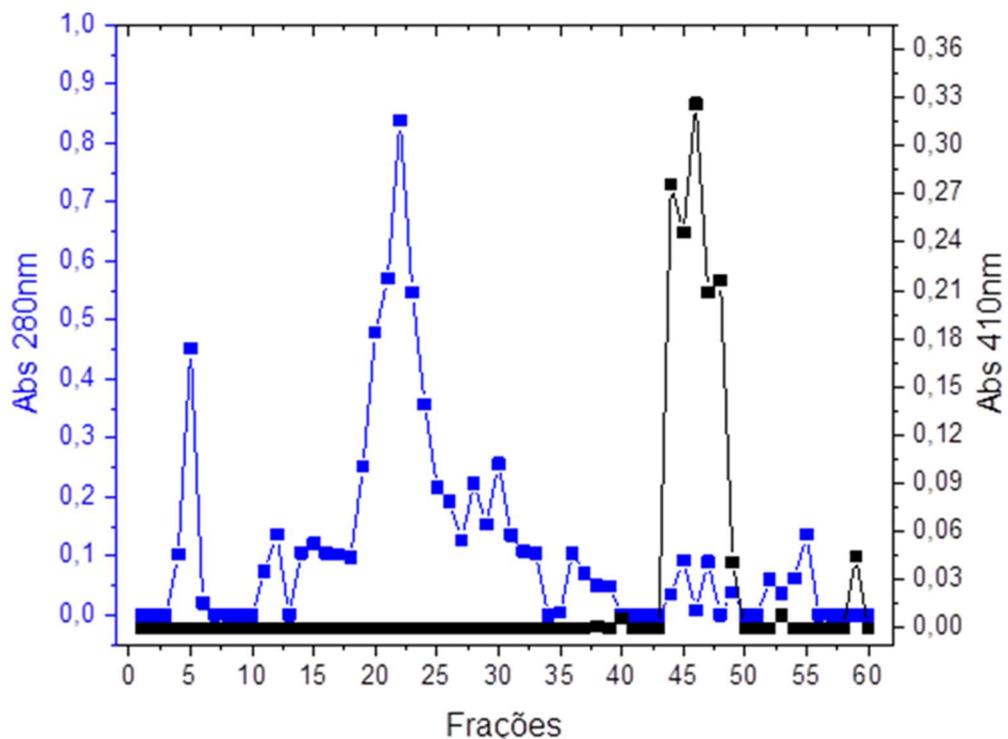
As recuperações na fase aquosa de cada SAT na ordem crescente de concentração foram 30,4%; 15,2%; 13,1% e 13,9%, respectivamente. Entre elas a maior recuperação foi a da fase aquosa do SAT com faixa de concentração de sal de 0-20%, sendo 30,4% da enzima recuperada. Por fim, o EEB ainda foi submetido a ultrafiltração utilizando concentrador centrífugo, composto por uma membrana com poros de 10 KDa. Nesse trabalho, o EEB ultrafiltrado apresentou uma recuperação da enzima de 48,2%, sendo a maior recuperação encontrada em todos os métodos testados.

A etapa de precipitação salina foi fundamental para retirar os contaminantes do extrato bruto e para concentrar a atividade da enzima em uma única fração. São dois os parâmetros observados nessa fase, a resolução, ou seja, a capacidade de concentrar a enzima em uma única fração e a recuperação, que é a quantidade de atividade efetivamente recuperada a partir do extrato bruto (SANTOS, D.M.R.C., 2018). A precipitação com solventes orgânicos foi utilizada como etapa inicial do processo de purificação de lipases microbianas. Em estudos como o de Ameri et al. (2017), na purificação da lipase da bactéria *Bacillus atrophaeus* FSHM2, utilizaram a precipitação com etanol, a 80% de saturação e seguida de diálise, encontraram uma recuperação de 39,8%.

### 5.2.2 Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100

A cromatografia de exclusão molecular é a próxima etapa depois de realizado o fracionamento salino. O EEB ultrafiltrado que foi escolhido na etapa anterior foi aplicado nessa etapa. O método cromatográfico do EEB ultrafiltrado para essa análise foi definido a partir do perfil eletroforético, que segundo KANEKO et al., (1997), trata-se de técnica fundamentada na migração de partículas protéicas, eletricamente carregadas, em um campo elétrico, possibilita o fracionamento eletroforético de proteínas séricas em suas diferentes frações. O qual apresentou um perfil de bandas mais separadas, isso indica a presença de proteínas com diferença significativa em relação ao peso molecular. Assim, a cromatografia de exclusão molecular, foi escolhida para purificar a lipase de *M. aphidis*, por ser um método cromatográfico que separa moléculas por tamanho, de acordo sua massa molar. O perfil da corrida cromatográfica é apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Cromatograma da purificação da lipase da levedura *Moesziomyces aphidis*, por cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100



Em azul = detecção de proteína por absorvância das frações a 280 nm, em preto = avaliação da atividade enzimática por absorvância a 410 nm.

Fonte: FERREIRA, A. N. (2022)

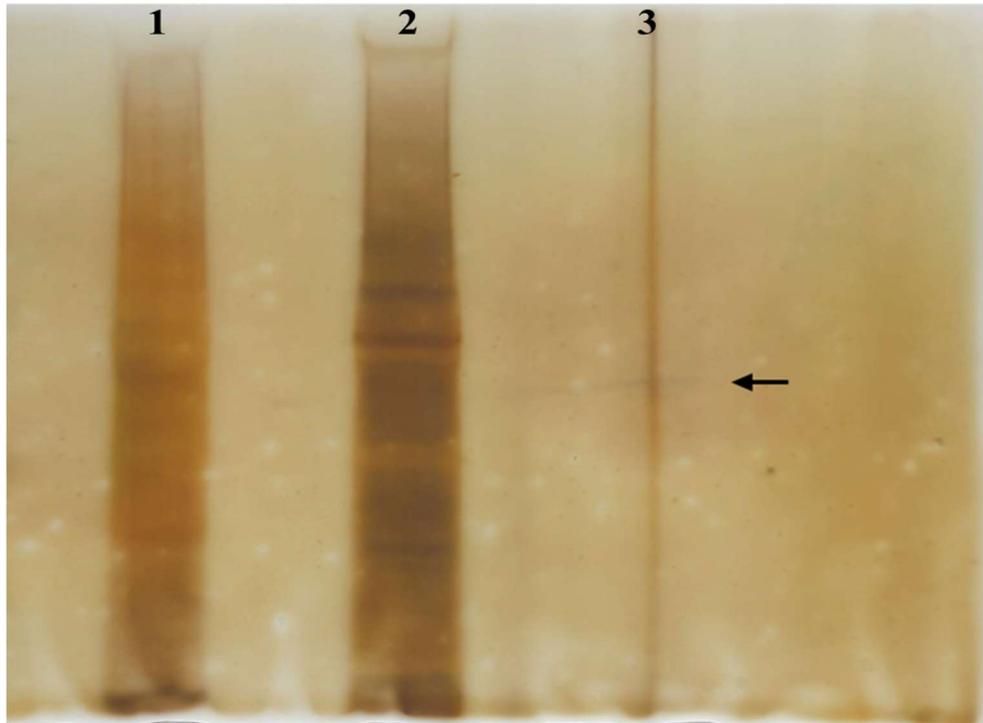
A Figura 7 apresenta um cromatograma, onde a linha azul apresenta os picos da concentração de proteína estimada a 280 nm e a linha preta a picos de lipase estimada pela quantificação do do *p*-NP a 410 nm, em cada fração da cromatografia. Da fração 44 até a 48 é possível perceber uma região com picos referente a lipase, a fração 46 apresenta a maior atividade de hidrólise na lipase. Em relação a região onde há concentração de proteína, observou-se que é baixa onde há presença da enzima e isso está relacionado a menor probabilidade de haver contaminantes ou algumas lipases diferentes onde há uma alta afinidade da enzima pelo substrato.

### 5.2.3 Eletroforese SDS-PAGE

Depois que as frações com lipases foram identificadas e escolhidas, foram aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE para serem avaliadas o perfil de bandas de fração, Figura 8.

Não é simples a obtenção de uma rota de purificação de enzimas utilizando apenas um método cromatográfico, no entanto pode ser alcançada e depende de variáveis como volume da coluna, fluxo adequado para eluição, escolha do melhor tampão de acordo com a enzima de interesse e quantidade de amostra aplicada na coluna (Santos, 2018). A utilização de apenas um passo cromatográfico para a purificação garante também uma boa taxa de recuperação, visto que dois ou mais passos cromatográficos (filtração em gel, troca iônica e afinidade) reduzem as taxas de recuperação (JUNIOR et al., 2012, ZHOU et al., 2016). As enzimas apresentam algumas características específicas para realizar sua atividade catalítica, elas dependem de temperaturas e pH específicos para atingir o máximo de sua atividade (FRANÇA, 2013).

Figura 8 - Eletroforese SDS-PAGE da purificação da lipase da levedura *Moesziomyces aphidis*



Legenda: linha 1 – extrato enzimático bruto, linha 2 - extrato enzimático bruto ultrafiltrado, linha 3 - fração 46.

Fonte: FERREIRA, A. N. (2022)

Como resultado, através do gel de filtração SDS-PAGE notasse que a purificação da lipase de *M. aphidis* por cromatografia de exclusão molecular foi confirmada. Na canaleta 1 é o extrato enzimático bruto, uma amostra com muitas bandas, na canaleta 2 é o extrato enzimático bruto ultrafiltrado, apresentando menos complexidade em comparação a 1 e a canaleta 3 apresentando fração 46 com a presença de uma banda assim evidenciando a purificação da lipase.

Por fim, a lipase da levedura *M. aphidis* foi purificada pelas etapas de: extrato enzimático bruto com uma recuperação de 100,00%, depois houve a ultrafiltração com uma recuperação de 48,21% e por fim a cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Sephacryl S-100, com recuperação final da enzima de 50,46%, percentual de enzima recuperada em relação a amostra aplicada na coluna cromatográfica. Houve

um aumento de recuperação da etapa da ultrafiltração para a etapa da cromatográfica. Isso ocorre devido a remoção de inibidores, durante a cromatografia, presentes na amostra antes da enzima ser isolada.

## 6 CONCLUSÃO

Esse foi o primeiro relato de produção de lipases pela levedura *M. aphidis* utilizando óleo de fritura residual e extrato de levedura como indutor e a primeira rota de purificação da lipase de *M. aphidis*, como resultado foi produzido uma enzima inédita. A melhor produção foi a que continha óleo de fritura residual (1%) e extrato de levedura (1%) em 48 h com atividade enzimática de  $3,83 \text{ U mL}^{-1}$ . A lipase da levedura *M. aphidis* foi purificada pelas etapas de ultrafiltração e cromatografia de exclusão molecular, com recuperação final da enzima de 50,46%. Cumprido assim com os objetivos propostos pelo trabalho.

## REFERÊNCIAS

- A.R. Ismail; S.B. El-Henawy; S.A. Younis; M.A. Betiha; S.S. Abu Amr; N.S. ElGendy; M.S. Azab; N.M. Sedky. **Optimization of a batch CaO-catalyzed transesterification of used domestic waste oil with methanol and elucidation of a mathematical correlation between biodiesel yield and percent conversion, energy sources, part a recover.** Resources, Conservation and Recycling. Volume 58, Jan 2017, Pags. 36-44. doi: 10.1080/15567036.2017.1284958.
- ABESO. **Da água à polpa: coco sacia e melhora ação do intestino**, Higienópolis, Agosto, 2021. Disponível em: <https://abeso.org.br/da-agua-a-polpa-coco-sacia-e-melhora-acao-do-intestino-veja-6-beneficios/>. Acesso em: 25 março. 2023.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004**: Resíduos sólidos – Classificação. 2 ed. Rio de Janeiro, 2004. 71 p. Disponível em: <https://analiticaqmresiduos.paginas.ufsc.br/files/2014/07/Nbr-10004-2004-Classificacao-De-Residuos-Solidos>. Acesso em: 01 abr. 2023.
- Adetunji, A. I., & Olaniran, A. O. (2020). **Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview.** Saudi Journal of Biological Sciences. doi:10.1016/j.sjbs.2020.10.058
- ALLBIOM - INTELIGÊNCIA EM PROCESSOS (Sp). **Fermentação Submersa de Fungos.** Desenvolvido por Yan Sanchez. Disponível em: <https://www.allbiom.com/fermentacao-submersa-de-fungos/>. Acesso em: 01 abr. 2023.
- ARAUJO, Camila Correia de. **Bromeliaceae Juss. no Distrito Federal (Brasil).** 2016. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2016.
- ARIEIRA, J. O., **Fundamentos do agronegócio.** UNIASSELVI, 2017. 221 p. : il. ISBN 978-85-515-0086-6
- Assis, J., Araújo, M. B., & Serrão, E. A. (2010). **Projected climate changes threaten ancient refugia of kelp forests in the North Atlantic.** Global Change Biology, 24(1), e55–e66. doi:10.1111/gcb.13818
- BARBOSA, G. N.; PASQUALETTO, A. **Aproveitamento do óleo residual de fritura na produção de biodiesel.** In. XXXI Congresso Interamericano AIDIS. Santiago, Chile, 12 a 15 de outubro, 2008, 2-8p.
- BFG - The Brazil Flora Group. **Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil.** Rodriguésia, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015. doi:10.1590/2175-7860201566411
- Bilema, M.; Aman, M. Y.; Hassan, N. A.; Al-Saffar, Z.; Mashaan, N. S.; Memon, Z. A.; Yusoff, N. I. M. (2021). **Effects of Waste Frying Oil and Crumb Rubber on the Characteristics of a Reclaimed Asphalt Pavement Binder.** Materials, 14(13), 3482. doi:10.3390/ma14133482

BINDIYA, P. A.; RAMANA, T. **Optimization of lipase production from an indigenously isolated marine *Aspergillus sydowii* of Bay of Bengal**. Journal of Biochemical Technology, v. 3, n. 5, p. 203-211, 2014.

BRÍGIDA, Ana Iraidy Santa. **Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Cardona, C. A., Quintero, J. A., & Paz, I. C. (2010). **Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives**. Bioresource Technology, 101(13), 4754–4766. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.097

Casas-Godoy, L., Gasteazoro, F., Duquesne, S., Bordes, F., Marty, A., & Sandoval, G. (2018). **Lipases: An Overview**. Methods in Molecular Biology, 3–38. doi:10.1007/978-1-4939-8672-9\_1

Castro, H. F. de, Mendes, A. A., Santos, J. C. dos, & Aguiar, C. L. de. (2004). **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. Química Nova, 27(1), 146–156. doi:10.1590/s0100-40422004000100025

CELSO OLIVEIRA (Curitiba). Abib - Brasil Biomassa Bioenergia Pellets (org.). **BIOCARBONO SOLUÇÃO ENERGÉTICA SIDERÚRGICAS E CIMENTEIRAS**. 2022. Disponível em: <https://www.brasilbiomassa.com.br/>. Acesso em: 07 abr. 2023.

CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. **Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities**. Applied Energy, v. 119, p. 497-520, 2014.

Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Khardziani, T., & Agathos, S. N. (2008). **Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(2), 331–339. doi:10.1007/s11274-008-9897-x

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. **Precipitation techniques**. in: Guide to protein purification, Eds. DEUTSCHER, M.P., Academic Press, San Diego, USA, 1990.

ESMERALDO, Victor Cavalcante; PEREIRA, Fabio Luiz. **A educação socioambiental a partir da pedagogia nas séries iniciais: a efficientização dos hábitos como proposta resolutiva**. In: IV Colóquio internacional educação e contemporaneidade. Anais - ISSN 1982-3657. Laranjeiras - Se: Educonufs, 2010. p. 01-07.

FARIA, N. T. et al. **Production of xylanolytic enzymes by *Moesziomyces spp.* using xylose, xylan and brewery's spent grain as substrates**. New biotechnology, v. 49, p. 137-143, 2019.

Fernanda Caro Beveridge; Sundaravelpandian Kalaipandian; Chongxi Yang and Steve W; Adkins. **Fruit Biology of Coconut (*Cocos nucifera L.*)**. Plants (Basel), 2022 Dez; 11(23): 3293.

FERREIRA, Alexsandra Nascimento. **Produção de lipases e protease fúngica em meio de baixo custo: purificação, caracterização e aplicação biotecnológica.** 2022. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de química e biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2022.

Geoffry, K., & Achur, R. N. (2018). **Screening and production of lipase from fungal organisms.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 241–253, 7-8p. doi:10.1016/j.bcab.2018.03.009.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. **Screening and production of lipase from fungal organisms.** *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v. 14, p. 241-253, 2018.

Georgia Vladimir Elisashvili Æ Eva Kachlishvili Æ Nino Tsiklauri Æ Eka Metreveli Æ Tamar Khardziani Æ Spiros N. Agathos. **Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of.** 2008

Gil, E.S. et al., **Aspectos técnicos e legais do gerenciamento de resíduos químico-farmacêuticos.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 43, n. 1, jan./mar., 2007

Gomes, Nayane Barroso; Dias, Kleydiane Braga; Ferreira Netto Teixeira, Mayra; Auler do Amaral Santos, Claudia Cristina; Almeida, Alex Fernando de Medium. **Composition and Amazonian oils for lipase production by *Candida viswanathii*.** *Acta Scientiarum. Technology*, vol. 40, january-december 2019, 2018 Universidade Estadual de Maringá Maringá, Brasil

GRAPIÚNA, A. (2012). **Flagrantes da Biologia apresenta imagens espetaculares:** Vídeos, sites, informações, curiosidades e fotos produzidas pelas lentes. Disponível em: <Disponível em: <http://www.biodersongrapiuna.blogspot.com/2012/12/blog-post.html> >. Acesso em: 22 jan. 2018.

HARALDSSON, G.G., **The applications of lipases for modification of fats and oils, including marine oils.** *Marine lipids Biotechnology*, v.118, 155-170, 2004.

Hassan, G., Muhammad, F., Khalil, F.H. and Raziuddin. (2006) **Heterosis and Heterobeltiosis Studies for Morphological Traits in Bread Wheat.** *Sarhad Journal of Agriculture*, 22, 51-54.

Horchani, F.; Khayati, H.; Raymond, P.; Brouquisse, R.; Aschi-Smiti, S. 2009. **Contrasted effects of prolonged root hypoxia on tomato root and fruit (*Solanum lycopersicum*) metabolism.** *Journal of Agronomy and Crop Science* 195: 313-318.

JACKSON, M. A. et al. **Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol.** In: Roy, H. E. et al. (Eds.). *The ecology of fungal entomopathogens.* Dordrecht: Springer, 2010. p. 129-146.

Jaeger, K. (1998). **Microbial lipases form versatile tools for biotechnology.** *Trends in Biotechnology*, 16(9), 396–403. doi:10.1016/s0167-7799(98)01195-0