



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**DAYANA PINTO DE MENESES**

**PRODUÇÃO DE ESTERASES POR *Aureobasidium pullulans* URM 7059  
UTILIZANDO GLICEROL RESIDUAL**

**FORTALEZA**

**2020**

DAYANA PINTO DE MENESES

PRODUÇÃO DE ESTERASES POR *Aureobasidium pullulans* URM 7059 UTILIZANDO  
GLICEROL RESIDUAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Rodrigues  
Coorientadora: Profa. Dra. Ligia Raquel Marona Rodrigues

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- M488p Meneses, Dayana Pinto de.  
Produção de esterases por *Aureobasidium pullulans* URM 7059 utilizando glicerol residual / Dayana Pinto de Meneses. – 2020.  
75 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Profa. Dra. Sueli Rodrigues.  
Coorientação: Profa. Dra. Ligia Raquel Marona Rodrigues.
1. esterases. 2. *Aureobasidium pullulans*. 3. glicerol. 4. fermentação submersa. I. Título.
- CDD 660
-

DAYANA PINTO DE MENESES

PRODUÇÃO DE ESTERASES por *Aureobasidium pullulans* URM 7059 UTILIZANDO  
GLICEROL RESIDUAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos

Aprovada em: 10/03/2020.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Sueli Rodrigues (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Ana Iraidy Santa Brígida  
Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT)

---

Prof. Dra. Kyria Santiago do Nascimento  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Tatiane Cavalcante Maciel  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Ivanildo Jose da Silva Junior  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A meus pais, Benício e Eugênia.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conduzir nas escolhas que faço.

A todos os colegas e amigos do Labiotec (UFC): Rhonyele Maciel, Andressa Galvão, Cristiano, Brenda, Maria Karolina, Ana Karolina, Elaine, Maria de Fatima, Rhonyele Braz e o Prof. Ítalo. Toda a companhia, amizade, paciência e momentos compartilhados durante os trabalhos realizados em laboratório. Aos demais profissionais que passaram pelo Labiotec: Ana Raquel, Soraya Sancho, Simone, Cristiane Rabelo e Niedila Afonso. Muito obrigada!

A Dra. Thatyane Vidal, Biotecnologista (Labiotec). Muito obrigada pela ajuda profissional nos experimentos, suporte nas dúvidas e acompanhamento para o melhor desempenho dos resultados desta Tese.

A professora Sueli Rodrigues (Labiotec), que me motivou a ser uma profissional melhor. Agradeço sua dedicação, a busca por melhores condições de trabalho para seus alunos e melhoria nas pesquisas desenvolvidas pelo seu grupo de colaboradores. Obrigada por toda dedicação, paciência, honestidade e incentivo.

A professora Ligia Rodrigues (UMINHO), pelas atribuições e colaboração para aprimorar a Tese. Muito obrigada por incentivar e favorecer a qualidade desse trabalho.

Agradeço a professora Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela grande contribuição para a banca de qualificação desta Tese. Obrigada pela generosa participação e correções valorosas.

Aos meus pais, Benicio Mameide e Eugênia Maria, pela educação, paciência e formação integral (coração e inteligência). A minha família e amigas de faculdade (Erika Patricia, Sinara, Lana, Maria Solange, Ana Vitória e Larrissa Fiúza) ainda muito próximas. Ao meu namorado, Jonas Viana. A Comunidade Católica Shalom, aos irmãos de missão, que são sustento para vida profissional, pessoal e missionária. Muito obrigada!

A Dra. Ana Iraidy Santa Brigida, a Dra. Kyria Santiago do Nascimento, a Dra. Tatiane Cavalcante Maciel e ao Dr. Ivanildo Jose da Silva Junior membros da banca, que auxiliaram a finalização desse trabalho. Obrigada pelas valorosas correções, contribuindo bastante para a melhor conclusão desta Tese.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de financiamento 001. Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação

Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro e bolsa recebida.

“A ciência e a tecnologia são um produto maravilhoso da criatividade humana que é um dom de Deus.” (São João Paulo 2)



## RESUMO

Explorar a biodiversidade microbiana abre uma série de possibilidades em relação à descoberta de novas enzimas, que são potencialmente úteis para aplicações industriais. As esterases (E.C. 3.1.1.1) pertencem à classe das carboxil ester hidrolases, e atuam na clivagem e formação de ligações ésteres. Assim, o objetivo deste trabalho, foi a produção de esterases por *Aureobasidium pullulans* URM 7059, utilizando glicerol residual de biodiesel como fonte de carbono, e sua caracterização bioquímica parcial. Inicialmente, foi realizado a otimização da composição do meio de cultura em agitador orbital, e as concentrações foram determinadas para glicerol (0,1% v/v), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 g/L) e extrato de levedura (8 g/L), durante 48 horas de fermentação. Foi avaliado a influência do pH e temperatura na atividade das esterases, sendo determinado as condições ótimas de 40 °C (p-NPC) e 50 °C (p-NPB) em pH 7. A esterase foi parcialmente purificada e a sua massa molar (50 kDa) foi estimada por SDS-PAGE e zimograma. A enzima manteve 90 % de atividade residual na faixa pH 6,0 – 7,0 a temperatura abaixo de 30°C. Os sais inorgânicos causaram uma diminuição pronunciada da atividade enzimática. Cu<sup>2+</sup> e Al<sup>3+</sup> não afetaram a atividade da esterase, enquanto o Ca<sup>2+</sup> promoveu a maior perda de atividade. Os parâmetros cinéticos K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> medidos foram 1,4 mM e 218 µmol min<sup>-1</sup> (p-NPC) e 1,55 mM e 76,76 µmol min<sup>-1</sup> (p-NPB), respectivamente. Por fim, esses valores mostraram que a enzima parcialmente purificada pode ser caracterizada como esterase, devido sua ação em ésteres de p-nitrofenol de cadeia curta. Em seguida, foram realizados estudos de aeração em biorreatores tipo tanque agitado e *airlift*. Esterase produzida por *A. pullulans* URM 7059 em reator tanque agitado (2L/min), mostraram atividade de 18,3 ± 0,9 U/mL (p-NPC) e 27 ± 1,3 U/mL (p-NPB). Testes com diferentes taxas de aeração (2, 4, 6 e 8L/min) em reator *airlift* sugeriram que maiores valores em atividade enzimática estão relacionados ao maior fluxo de oxigênio, produzindo 31 U/mL (p-NPC e p-NPB) em 8 L/min. A enzima foi precipitada em NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> e o perfil de proteínas em Nativa-PAGE apresentou bandas ativas em zimograma de massa molar aproximada de 172 kDa, 66 kDa and 40 kDa. Por fim, a esterase produzida por *A. pullulans* URM 7059 em reator *airlift* mostrou sua capacidade para atuar na degradação do biopolímero MACO-St nas cadeias de hidrocarbonetos (CH<sub>2</sub>) com ampla faixa de estabilidade de pH (7,0 – 9,0) e temperatura (40 °C – 80 °C).

**Palavras-chave:** esterases; *Aureobasidium pullulans*; glicerol; fermentação submersa.

## ABSTRACT

Exploring the microbial biodiversity opens several possibilities regarding the discovery of new enzymes with biochemical advantages over the existing ones that are potentially useful for many industrial applications. The esterases (E.C. 3.1.1.1) belong to the class of carboxyl ester hydrolases that catalyze the cleavage of triglyceride ester bonds. Thus, in the current work, the esterase production by *Aureobasidium pullulans* URM 7059, using the residual biodiesel glycerol as a carbon source, was optimized. The highest esterase activity was obtained in a rotatory shaker using a medium composed of glycerol (0.1% v/v), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 g/L) and yeast extract (8 g/L). The enzyme was partially purified and its molar mass (50 kDa) was estimated by SDS-PAGE and zymography. The enzyme is stable at pH 6.0 to 7.0 in 90 % and temperatures below 30°C. Inorganic salts caused a pronounced decrease in the enzyme activity. Cu<sup>2+</sup> and Al<sup>3+</sup> did not affect the esterase activity, while Ca<sup>2+</sup> promoted the highest activity loss. The kinetic parameters K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> measured were 1.4 mM and 218 μmol min<sup>-1</sup> (*p*-NPC) and 1.55 mM and 76.76 μmol min<sup>-1</sup> (*p*-NPB), respectively. Ultimately, these values showed that the enzyme partially purified is an esterase due to the action in short –chain *p*-nitrophenol esters. The enzyme was produced in batch and airlift reactor. Then, studies were carried out to increase the scale of production in a stirred tank and airlift bioreactors. The activity values in stirred tank reactor (2L/min) were 18.3 ± 0.9 U/mL (*p*-NPC) and 27 ± 1.3 U/mL (*p*-NPB). Tests with different aeration rates (2, 4, 6 and 8L/min) in airlift reactors suggested that the maximum activities are related to the higher oxygen flow rate. The enzyme activity obtained at 8 L of air/min (airlift), was 35 U/mL (culture broth) at 24 hours of fermentation. The kinetic parameters K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> measured were 1.4 mM and 218 μmol min<sup>-1</sup> (*p*-NPC) and 1.55 mM and 76.76 μmol min<sup>-1</sup> (*p*-NPB), respectively. The enzyme was precipitated in NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>. The esterase activity bands in native gel revealed proteins with molecular mass of 172 kDa, 66 kDa and 40 kDa. The esterase produced by *A. pullulans* URM 7059 in airlift bioreactor was also able to degrade the MACO-St biopolymer with stability in wide range of pH (7.0 – 9.0) and temperature (40 °C – 80 °C).

**Keywords:** esterase; *Aureobasidium pullulans*; glycerol; submerged fermentation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da dobra $\alpha/\beta$ hidrolase. $\beta$ -Folhas (1 – 8) são mostradas com setas azuis, $\beta$ -hélices (A – F) como colunas vermelhas. As posições relativas dos aminoácidos da tríade catalítica são indicadas como círculos laranja.....	20
Figura 2 -	Molécula de glicerol (1,2,3-propanotriol).....	24
Figura 3 -	Levedura <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7059.....	32
Figura 4 -	Biorreator de bancada do tipo tanque agitado (a) e Airlift (b).....	35
Figura 5 -	Fluxograma da precipitação de esterases utilizando diferentes protocolos.....	37
Figura 6 -	Fluxograma da precipitação de esterases utilizando diferentes protocolos.....	38
Figura 7 -	Estrutura molecular do polímero MACO-St.....	40
Figura 8 -	Fermentação por <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7059 utilizando extrato de levedura (5 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (6 g/L), glicose (1 g/L), glicerol residual (1% m/m), $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (1 g/L) e Tween 80 (0,4% v/v) em meio de cultura. Concentração de glicose (g/L) (a); Concentração de glicerol (g/L); Concentração de biomassa (g/L); Atividade da esterase usando diferentes substratos, como caprilato (●) e butirato (■). Os resultados correspondem à média de três medições $\pm$ desvio padrão.....	42
Figura 9 -	Efeito das fontes de nitrogênio e carbono na atividade da esterase produzida por <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7059. A atividade enzimática foi avaliada utilizando os substratos caprilato (a) e butirato (b). Os resultados correspondem à média de três medições $\pm$ desvio padrão.....	44
Figura 10 -	SDS-PAGE gel que ilustra o perfil das proteínas precipitadas por diferentes protocolos. Marcador de peso molecular de proteínas (Perfil M); caldo bruto isento de células (Perfil 1); Proteína precipitada com: PEG 1500 (Perfil 2), PEG 4000 (Perfil 3), PEG 6000 (Perfil 4); sobrenadante do caldo bruto dialisado (Perfil 5); Proteína precipitada com: fração 30% (m/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Perfil 6),	47

	fração 30-90% (m/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Perfil 7); meio de cultura (Perfil 8).....	
Figura 11 -	Gel nativa PAGE para as etapas de precipitação com (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Perfil 1) e PEG 6000 (Perfil 2). Zimograma (Perfil 3: proteínas precipitadas por (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fração 30-90%; Perfil 4: proteínas precipitadas por PEG 6000 foi realizado para identificar a atividade das bandas de proteínas ativa .....	48
Figura 12 -	pH (a) e temperatura (b) de estabilidade de esterase parcialmente purificada produzida por <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7059. A atividade enzimática foi determinada utilizando o substrato caprilato (p-NPC). Os resultados correspondem à média de três medições ± desvio padrão.....	48
Figura 13 -	Parâmetros cinéticos de esterase parcialmente purificada.....	52
Figura 14 -	Produção de esterase por <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7059 em <i>shaker</i> (a) e reator tanque agitado (b). Os resultados correspondem à média de três medições ± desvio padrão.....	53
Figura 15 -	Resultados da atividade de esterase (U/mL), oxigênio dissolvido (DO%), pH, biomassa (g/L) e consumo de glicerol (g/L) em reator <i>airlift</i> com taxa de aeração de 2, 4, 6 e 8 (L/min). Os resultados correspondem à média de três medições ± desvio padrão.....	54
Figura 16 -	Cinética de crescimento da produção de esterases em biorreator <i>Airlift</i> (8 L/min) por <i>A. pullulans</i> URM 7059. Os resultados correspondem à média de três experimentos independentes ± desvio padrão.....	55
Figura 17 -	(a) pH e (b) temperatura da estabilidade de esterase parcialmente purificada produzida por <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7059. A atividade enzimática foi determinada usando substrato caprilato (p-NPC). Os resultados correspondem à média de três medidas ± desvio padrão. (c) gel e zimograma de Nativa-PAGE: proteínas precipitadas por (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : fração 30 % (Perfil 1); fração 30%-90% (Perfil 2); Perfil 3: bandas de proteínas ativa da fração 30 % e Perfil 4: fração 30%-90%; M (marcador de peso molecular de proteínas).....	57

Figura 18 - Análise de Fourier espectrometria de infravermelho (FTIR) da ação de esterases sobre o polímero (MACO-St)..... 59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Microrganismos produtores de esterases.....	22
Tabela 2 -	Principais fontes de carbono e nitrogênio para produção de esterases em processos fermentativos submerso.....	25
Tabela 3 -	Parâmetros de pH, temperatura e peso molecular de esterases produzidas por microrganismo.....	30
Tabela 4 -	Seleção de pH e temperatura para o ensaio enzimático de esterase usando os substratos de p-nitrofenil caprilato (p-NPC) e p-nitrofenil butirato (p-NPB). Os resultados correspondem à média de três medições ± desvio padrão. 1: temperatura fixada a 30°C; 2: pH 7,0.	43
Tabela 5 -	Planejamento fatorial fracionado ( $2^{3-1}$ ) para seleção das variáveis que afetam a produção de esterase por <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7059. Os resultados correspondem à média de três medições ± desvio padrão.....	45
Tabela 6 -	Planejamento composto central ( $2^2$ ) usado para otimizar a produção de esterase por <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7059. (C): ponto central. Os resultados correspondem à média de três medições ± desvio padrão.....	46
Tabela 7 -	Precipitação de esterase precipitada por diferentes protocolos a 25 °C.	49
Tabela 8 -	Efeito de diferentes íons metálicos na atividade da esterase produzida por <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7059. Os resultados correspondem à média de três medições ± desvio padrão. Controle: ausência de íons metálicos.....	51
Tabela 9 -	Etapas de precipitação da esterase extracelular produzida por <i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7059.....	58

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Esterases.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Microrganismos produtores de esterases.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.1</b>	<i>Aureobasidium pullulans.....</i>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Fatores que afetam a produção de esterases.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4</b>	<b>Reatores do tipo Tanque Agitado e Airlift .....</b>	<b>25</b>
<b>2.5</b>	<b>Aplicação das esterases.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5.1</b>	<i>Indústria de Alimentos.....</i>	<b>26</b>
<b>2.5.2</b>	<i>Degradação de materiais poluentes.....</i>	<b>27</b>
<b>2.5.3</b>	<i>Indústria Química e Farmacêutica.....</i>	<b>27</b>
<b>2.6</b>	<b>Purificação e caracterização de esterases.....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Microrganismo.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Produção da esterase.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2.1</b>	<i>Atividade enzimática.....</i>	<b>33</b>
<b>4.2.2</b>	<i>Efeito da temperatura e pH para determinar a atividade enzimática....</i>	<b>33</b>
<b>4.2.3</b>	<i>Otimização da composição do meio de cultura.....</i>	<b>33</b>
<b>4.2.4</b>	<i>Produção de esterases por A. pullulans URM 7059 em biorreatores do tipo tanque agitado e airlift.....</i>	<b>34</b>
<b>4.2.5</b>	<i>Determinação do consumo de glicerol.....</i>	<b>35</b>
<b>4.2.6</b>	<i>Cálculo da produtividade de esterase.....</i>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Pré-purificação das esterases.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.1</b>	<i>Precipitação das esterases.....</i>	<b>36</b>
<b>4.3.1.1</b>	<i>Esterase produzida por Aureobasidium pullulans URM 7059 em skaker.</i>	<b>36</b>
<b>4.3.1.2</b>	<i>Esterase produzida por Aureobasidium pullulans URM 7059 em Biorreatores .....</i>	<b>37</b>
<b>4.3.2</b>	<i>Caracterização parcial das esterases .....</i>	<b>38</b>

4.3.2.1	<i>Eletroforese e zimograma</i> .....	38
4.3.2.2	<i>Efeito do pH, temperatura e sais na estabilidade das esterases</i> .....	38
4.3.2.3	<i>Parâmetros cinéticos</i> .....	39
4.4	<b>Aplicação das esterases</b> .....	39
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
5.1	<b>Esterase produzida por <i>A. pullulans</i> URM 7059</b> .....	41
5.2	<b>Seleção de temperatura e pH ótimo para atividade enzimática</b> .....	42
5.3	<b>Otimização da composição do meio de cultura para produção de esterases</b> .....	43
5.4	<b>Caracterização parcial de esterase produzida em <i>shaker</i></b> .....	46
5.4.1	<i>Precipitação da esterase</i> .....	46
5.4.2	<i>Temperatura, pH e concentração de sais na estabilidade da esterase</i> .....	50
5.4.3	<i>Parâmetros cinéticos</i> .....	51
5.5	<b>Produção de esterases em biorreatores</b> .....	52
5.5.1	<i>Produção de esterase em biorreator do tipo Tanque Agitado (STR)</i> .....	52
5.5.2	<i>Produção de esterase em biorreator do tipo Airlift</i> .....	53
5.5.2.1	<i>Caracterização parcial da esterase</i> .....	55
5.6	<b>Aplicação das esterases</b> .....	58
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	60
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61
	<b>ANEXO A – PRECIPITAÇÃO DE ESTERASE PRODUZIDA POR <i>A. pullulans</i> URM 7059 EM SHAKER</b> .....	73
	<b>ANEXO B – PRODUÇÃO DAS ESTERASES PRODUZIDAS POR <i>A. pullulans</i> URM 7059 EM BIORREACTORES</b> .....	74



## 1 INTRODUÇÃO

As esterases pertencem ao grupo das hidrolases, que catalisam a hidrólise das ligações ésteres em triacilgliceróis compostos de ácidos graxos de cadeia curta, solúveis em água. Essas enzimas lipolíticas podem ser produzidas por plantas, animais e microrganismos. Entretanto, as esterases de origem microbiana possuem diferentes propriedades bioquímicas que contribuem para aplicações industriais (Corrêa et al., 2013; López et al., 2014). A maioria dessas enzimas são produzidas pelo gênero *Bacillus*, também de outras estirpes bacterianas, como as *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (SAMESHIMA-YAMASHITA et al., 2018). As espécies de *Aureobasidium* sp. ainda são pouco relacionadas a síntese de esterases (KUDANGA et al., 2007), e em geral, abordam a síntese de pululanos (SARUP et al., 2017), óleos pesados (MANITCHOTPISIT et al., 2014), lipases (LEATHERS et al., 2013) e biossurfactantes (MENESES et al., 2017).

O potencial biotecnológico das enzimas lipolíticas é comprovado pelos valores de mercado global, os quais alcançaram US\$ 5 bilhões em 2016. A previsão de aumento desse mercado será de 6% a 8% em 2020, alcançando aproximadamente US\$ 7 bilhões (GUERRAND, 2017). Esse mercado abrange atualmente importantes empresas internacionais como Fluka, Novozymes, Sigma-Aldrich Ltda. (SINGH et al., 2016). As esterases contribuem para diversos processos industriais na síntese de aromas, fármacos, biopolímeros e separação de misturas racêmicas (LEHMANN et al., 2014; ZHENG et al., 2017). Portanto, o isolamento de novas esterases contribui para o estudo de suas características de regioespecificidade e regioseletividade em diversas reações favorecendo o aumento do rendimento catalítico (TAKAÇ; ÜNLÜ; ERDEM, 2010).

O glicerol é uma fonte de carbono versátil que por ter uma molécula simples é degradado em diferentes intermediários metabólicos durante a fermentação (Almeida et al., 2012). O uso crescente de resíduos na produção de biomoléculas de interesse industrial vem sendo alvo de estudos nos últimos anos. Dessa forma, alguns co-produtos são úteis na elaboração de meios de cultura, como fonte de nutrientes. Por exemplo, estudos relacionaram a eficiência na síntese de enzimas utilizando glicerol bruto como indutor por *Yarrowia lipolytica* (MAGDOULI et al., 2017a), além de produção de lipídeos (SOUZA et al., 2017) e biossurfactantes (MATOS et al., 2017). Considerando que nos últimos anos o preço desse resíduo vem diminuindo cerca de 20%, a estratégia do uso do glicerol para produção de um

produto de alto valor comercial, como as esterases, é bastante promissor para o mercado de enzimas (KOWALCZYK et al., 2018).

Outro fator importante na produção de enzimas microbianas é o estudo dos parâmetros de produção, que vão desde a composição do meio de cultura (fonte de carbono, nitrogênio, sais minerais), bem como a taxa de oxigênio dissolvido (DO%), pH, temperatura e biomassa. Dessa forma, tipos biorreatores usados devem favorecer uma alta produtividade. Por isso os biorreatores devem ser escolhidos de acordo com o tipo de microrganismos e a biomolécula de interesse, levando em consideração a taxa de cisalhamento, capacidade de mistura na dorna, transferência de calor e de massa e consumo de energia. Diante disso, os reatores do tipo tanque Agitado são os mais utilizados na indústria de enzimas, e outros do tipo *Airlift*, são bastante promissores para processos aeróbios.

Portanto, o objetivo deste trabalho, foi realizar o estudo da produção de esterase por *Aureobasidium pullulans* URM 7059, utilizando o glicerol residual como fonte de carbono, em cultivo por fermentação submersa. Foram realizados estudos da composição do meio de cultura pela ferramenta de planejamento experimental, caracterização bioquímica parcial da enzima e aumento da escala de produção em biorreatores do tipo Tanque agitado e *Airlift*.

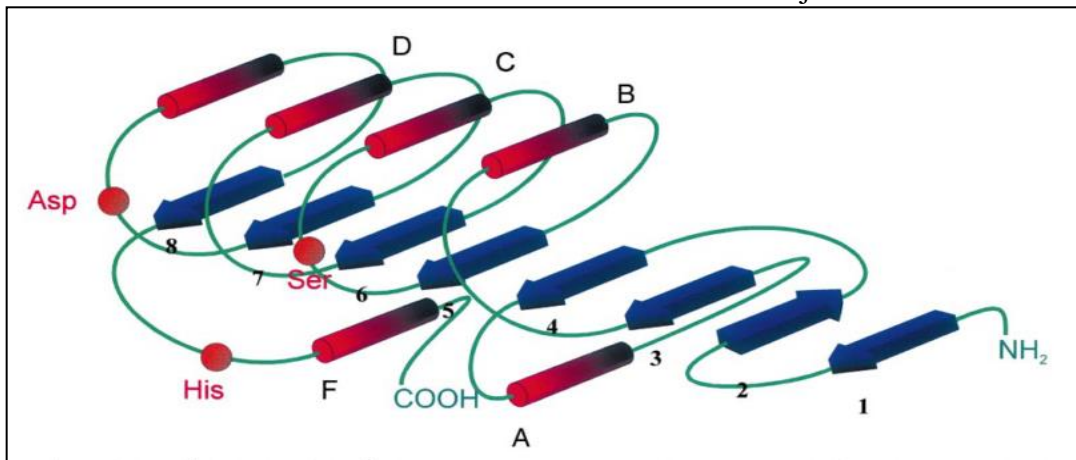
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Esterases

As lipases (E.C. 3.1.1.3) e esterases (E.C. 3.1.1.1) são os dois maiores grupos da classe das hidrolases, que catalisam a hidrólise e síntese de triacilgliceróis nas ligações éster (CAMACHO et al., 2009; KANG et al., 2011). Esterases possuem uma maior afinidade por substratos de menor hidrofobicidade, ou seja, sua atividade enzimática é restrita a substratos solúveis em água. Atuam sobre a hidrólise de triacilgliceróis compostos por ácidos graxos solúveis de cadeia curta (<10 átomos de carbono), tais como butirato de metila, butirato de etila, que são pouco hidrolisados pelas lipases. Enquanto as lipases hidrolisam triacilgliceróis de cadeia média e longa insolúveis em água (HUANG; ZHANG; HU, 2016; VALENZUELA et al., 2014). Chahinian e Sarda (2009), concluíram que o processo de ativação interfacial das lipases, ocorre devido uma alteração na conformação da enzima especificamente ligada a partículas de emulsão (ou na presença de substâncias hidrofóbicas). No qual o sítio ativo é coberto por um *loop* peptídico (tampa), que tem que se afastar para dar acesso ao substrato. Dessa forma, foi correlacionada a transição entre a tampa fechada (inativa) e a tampa aberta (ativa) da lipase.

Elas são membros da superfamília  $\alpha/\beta$  hidrolase, com atividade enzimática baseada na tríade catalítica formada por resíduos Ser, His e Asp com serina incorporada na sequência Gly-x-Ser-x-Gly no sítio ativo (CHOI et al., 2016; LEE, 2016). As esterases foram identificadas contendo Gly-x-x-Leu (HOTTA et al., 2002; JENSEN et al., 2016; VAQUERO et al., 2015). Estudo realizado por Dimitriou et al., (2017) descreveram que as enzimas constituídas por  $\alpha/\beta$  hidrolase, além de possuir uma diversidade de funções enzimáticas, possibilitam que a partir dos seus resíduos catalíticos possam ser alvo de exploração de distintos mecanismos de catálise para atuar em uma ampla variedade de substratos. A Figura 1 demonstra a folha  $\alpha/\beta$  hidrolase e seus aminoácidos.

**Figura 1** - Representação esquemática da dobra  $\alpha/\beta$  hidrolase.  $\beta$ -Folhas (1 – 8) são mostradas com setas azuis,  $\beta$ -hélices (A – F) como colunas vermelhas. As posições relativas dos aminoácidos da tríade catalítica são indicadas como círculos laranja



Fonte: BORNSCHEUER et al., (2002).

As esterases podem ser produzidas por microrganismos (bactérias, fungos e leveduras), plantas e animais. O interesse pelas esterases de origem microbiana está relacionado as suas diferentes propriedades bioquímicas, as quais favorecem sua aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (GUDIUKAITE et al., 2017; LÓPEZ-LÓPEZ; CERDÁN; SISO, 2014). Essas propriedades conferem a enzima uma especificidade sobre diferentes substratos, hidrólise de ésteres, catálise em reações de transesterificação, e outras reações com alta eficiência catalítica. Devido sua estabilidade as esterases são biocatalisadores atrativos, pois suas propriedades como alta regio-, quimio- e enantiosseletividade, sugerem a ausência de co-fatores (LI et al., 2017; RANJAN et al., 2018).

O estudo de novas esterases com propriedades bioquímicas versáteis em processos industriais é crescente nos últimos anos (LAI et al., 2018). A eficiência catalítica das enzimas está relacionada com sua capacidade para atuar em reações químicas, bem com sua reposta a condições adversas (WANG et al., 2018). Esterases psicrótróficas atuam com alta eficiência catalítica em baixas temperaturas (0 – 10°C) (WICKA et al., 2016). Consequentemente, essas esterases possuem uma ampla aplicação em indústrias alimentícias e na síntese de compostos orgânicos termolábeis (RAHMAN et al., 2016). Além disso, esterases adaptadas ao frio são relevantes a processos que envolvem reações químicas indesejáveis em altas temperaturas (WU et al., 2013). Charoenpanich et al., (2018) reportaram que a esterase produzida por *Bacillus aerophilu* apresentava baixa atividade residual em faixas de temperatura superiores a 45°C e 70% de atividade residual entre 5 e 35°C.

Outras esterases apresentam além da tolerância a altas temperaturas, resistência a condições extremas de pH, salinidade e a presença de solventes orgânicos (CASTILLA et al., 2017). Essas características combinadas, dependendo das reações catalíticas em que serão aplicadas podem trazer vantagens para o processo industrial (ZARAFETA et al., 2016). Esterases com alta estabilidade na presença de sais e ao detergente SDS foram produzidas por *Alkalibacterium* sp. SL3(WANG et al., 2016). Foi relatado por Rahman et al., (2016) que a esterase psicrotrófica produzida pela bactéria *Zunongwangia profunda* era inativada a 60°C, mas estável na presença dos detergentes Tween 20, Tween 80 e Triton X-100.

## 2.2 Microrganismos produtores de esterases

As esterases podem ser produzidas por plantas, animais e microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos). As enzimas microbianas, apresentam grande importância industrial, devido sua estabilidade, seletividade e ação em substratos específicos (Corrêa et al., 2013; López et al., 2014). Devido à grande variedade de microrganismos, o isolamento de enzimas é promovido por diferentes mecanismos de produção, os quais podem ser desde as técnicas tradicionais de cultivo por fermentação submersa até a manipulação genética (PRIJI et al., 2015). O mapeamento de microrganismos por técnicas tradicionais é uma das principais fontes no *screening* de novas enzimas, o que favorece sua aplicação em diferentes áreas da biotecnologia industrial (CURCI et al., 2019). Buzzini e Martini et al., (2002) estudaram a diversidade na síntese de enzimas em 348 leveduras, das quais para produção de esterases, destacaram-se as cepas: *Pichia anomala*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida maltosa*, *Pichia guilliermondii*, *Torulaspora delbrueckii*. O desempenho do fungo *Monascus ruber* na produção de esterases, foi relatado por Guo et al. (2016) com atividade específica de 136,4 U/mg (pNP-butirato). Outras pesquisas desenvolvem mecanismos para clonagem de genes específicos, os quais são responsáveis pelo aumento da ação catalítica da enzima (FANG et al., 2014; JAYANATH et al., 2018). A Tabela 1 representa alguns microrganismos produtores de esterases.

Tabela 1- Microrganismos produtores de esterases

<b>Microrganismo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Atividade</b>	<b>Referência</b>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	pNP- caprilato	1,5-12,8 U/mL	Kudanga et al., 2007
<i>Bacillus subtilis</i>	pNP-butirato	138,40 U/mL	Bao et al., 2012
<i>Psychrobacterceler</i>	pNP-butirato	6,73U/mL	Wu et al., 2013
<i>Penicillium griseoroseum</i>	pNP- caprilato	0,021 U/mL	Corrêa et al., 2013
<i>Lactobacillus brevis</i>	pNP-butirato	36,6 U/mL	Park et al., (2013)
<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	pNP- caprilato	0,143 U/mL	Valenzuela et al., 2014
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	pNP-butirato	3 U/mL	Lehmann et al., 2014

### 2.2.1 *Aureobasidium pullulans*

O gênero de *Aureobasidium* pertence à família *Sacotheciaceae* da classe dos *Dothideomycetes* (GOSTINČAR et al., 2014). As variedades fenotípicas desse fungo foram relatadas em torno de 38 espécies, sendo *A. pullulans* a mais estudada (NASR et al., 2018). *Aureobasidium* pode crescer como levedura ou micélio em aparência escura ou hialina, dependendo das condições ambientais e (sub) espécies. A levedura *Aureobasidium pullulans* possui colônias com pigmentação de cor rósea, e a partir de 7 dias de crescimento desenvolve uma cor marrom escura em ágar batata a 25 °C. A levedura *Aureobasidium* está presente em uma diversidade de ambientes naturais (solo, madeira e água) e também pode ser isolado a partir de frutas, tais como uva, maçã, morango, caju e vegetais frescos. Seu crescimento ideal acontece na presença de oxigênio, por ser aeróbica, faixa de temperatura de 25 °C a 30 °C em pH entre 5,5 e 7,0.

A levedura *Aureobasidium pullulans* é conhecida por sua capacidade produtora de pululano e enzimas extracelulares incluindo as celulases, lipases e xilanases (DUAN et al., 2008; XUE et al., 2012). O potencial dessa levedura vem sendo explorado também para produção de óleos extracelulares, no tratamento de vinhos, na síntese de oligossacarídeos e na redução do teor de acrilamida em alimentos (DI FRANCESCO et al., 2019; MANITCHOTPISIT et al., 2014; MERÍN; MORATA DE AMBROSINI, 2018; VICTORIA GAUTÉRIO et al., 2018).

Apesar da produção de esterases por *A.pullulans* ainda ser pouco reportada, estudo recente avaliou diferentes etapas de purificação de esterase produzida por essa levedura (CESAR LEMES et al., 2018). Outros estudos também relataram a produção de esterases por *A.pullulans* (Kudanga et al., 2007) e por outra estirpe *Aureobasidium melanogenum* HN6.2(CHEN et al., 2017b).

### 2.3 Fatores que afetam a produção de esterases microbianas

As condições de produção de esterases por microrganismos são diretamente influenciada por parâmetros físico-químicos e bioquímicos. Os principais a serem considerados são: pH, temperatura, agitação, tempo de incubação, taxa de aeração e composição do meio de cultura (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009). Dessa forma, o ajuste desses fatores é fundamental para estimular ou reprimir sua produção em processos fermentativos.

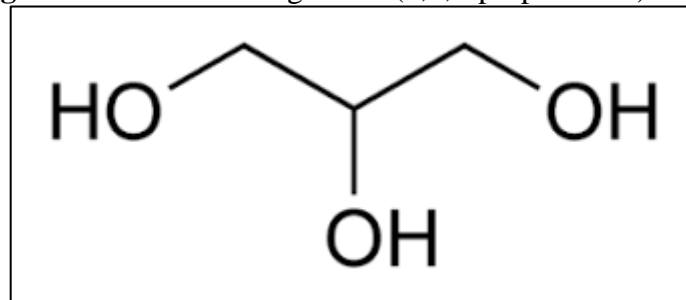
A composição do meio de cultura é influenciada pela fonte de carbono, nitrogênio, sais minerais e outros elementos que possam induzir a produção da enzima (ESPOSITO *et al.*, 1973). Em estudo realizado por Kang et al., (2017) concluíram que a máxima atividade de esterases produzida por *Bacillus* sp. foi relacionada com a otimização do tempo de fermentação, fonte de nitrogênio e a concentração de oxigênio dissolvido. As condições de cultivo para *Bacillus subtilis*, indicaram que as concentrações de glicose, sulfato de amônio e inóculo influenciaram o aumento de produtividade da enzima (ACHARYA; SHILPKAR; SHAH, 2016). Os parâmetros de temperatura 30°C e pH 7,0 foram otimizados para produção de esterases através de planejamento experimental, associados a composição de milho (40 g/L), ácido oléico (2 g/L) e trioleína (10 g/L) (MAZON et al., 2008).

As fontes de carbono que se destacam para a produção de enzimas lipolíticas (esterases e lipases) são: glicose, frutose, maltose, xilose e lactose (ESAKKIRAJ et al., 2012; MORAIS; ABUD, 2012). Alguns resíduos agroindustriais também são utilizados para o crescimento microbiano, assim como indutores, tais como o glicerol, efluentes da produção de azeite e de outros óleos comestíveis (DAVID et al., 2016; ELAZZAZY; ABDELMONEIM; ALMAGHRABI, 2015). A substituição por fontes renováveis proporciona a redução dos custos do processo e permite a criação de novas rotas produtivas para o resíduo utilizado (CERQUEIRA et al., 2010; IMURA et al., 2013).

O glicerol é um dos principais subprodutos gerados na produção do biodiesel no Brasil, segundo dados da ANP (Agência Nacional do Petróleo), em 2018 foram gerados 440,6

mil m<sup>3</sup> de glicerol, oriundos da produção de 5,4 milhões m<sup>3</sup> de Biodiesel. O glicerol residual é consumido principalmente pelas indústrias de cosméticos, farmacêutica e química. Esse subproduto possui uma molécula simples (Figura 2) que pode ser transferida para dentro da célula microbiana por difusão facilitada, e assim ser convertida em diferentes intermediários metabólicos e com rendimentos semelhantes aos açúcares utilizados como substrato. Desse modo, o glicerol pode torna-se uma promissora fonte de carbono para a síntese de enzimas (ALMEIDA; FÁVARO; QUIRINO, 2012). Robert et al., (2017) utilizaram o glicerol bruto como fonte de carbono para produção de lipase por *Candida antarctica*. Na área de microbiologia, as alternativas para valorização desse resíduo foram relatadas em vários trabalhos para produção de lipase (MAGDOULI et al., 2017b; YAN et al., 2018), triglicerídeos (BINHAYEEDING; KLOMKLAO; SANGKHARAK, 2017), lipídeos e biossurfactantes (MOUAFO; MBAWALA; NDJOUENKEU, 2018; SOUZA et al., 2018).

**Figura 2** – Molécula de glicerol (1,2,3-propanotriol)



Fonte: BEATRIZ; ARAÚJO; DE LIMA, 2011.

O nitrogênio é um dos principais componentes do meio de cultura, sendo importante não só para o crescimento celular, mas também na produção de ácidos nucleicos e proteínas, os quais influenciam diretamente na produção de esterases (MADIGAN, MARTINGO e PARKER, 2004). O tipo de fonte de nitrogênio orgânico como a peptona, caseína, extrato de levedura e triptona foram relatados como adequados para a produção de esterases, bem como para o rendimento da enzima (DARVISHI et al., 2011; KUDANGA et al., 2007; PAPAGORA; ROUKAS; KOTZEKIDOU, 2013). A milhocina (*CSL-corn steep liquor*) é um dos resíduos mais atrativos na produção de esterases, pois sua composição é rica em aminoácidos essenciais como descrito por Ren et al., (2006). A Tabela 2 descreve as principais fontes de nutrientes na produção de esterases.



Tabela 2 – Principais fontes de carbono e nitrogênio para produção de esterases em processos fermentativos submerso

<b>Microrganismo</b>	<b>Fonte de carbono</b>	<b>Fonte de nitrogênio</b>	<b>Referência</b>
<i>B. subtilis</i>	Glicose (0,05 g/L)	Peptona (0,1 g/L)	(KAISER et al., 2006)
<i>E. coli</i>	Glicose (5 g/L)	Peptona (40g/L) extrato de levedura (20 g/L)	(QIAO et al., 2006)
<i>Lysinibacillus fusiformi</i>	Glicose (4 g/L)	Extrato de levedura (4 g/L)	(SURYIA PRABHA et al., 2015)
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	Glicose (10 g/L)	Peptona (10 g/L)	(MAZZUCOTELLI; MOREIRA; ANSORENA, 2015)
<i>E.coli</i>	Glicose (5 g/L)	Extrato de levedura (2 g/L)	(JAWED et al., 2016)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Glicose (1 g/L)	Peptona (15 g/L)	(MAZZUCOTELLI; MOREIRA; ANSORENA, 2016)

Os surfactantes Tween-80, Tween-20, Triton X-100 promovem um efeito estimulante na síntese de esterases, pois favorecem o aumento da permeabilidade da membrana celular microbiana (BRESCIANI et al., 2014; DE; LIU; WANG, 2015; LIU et al., 2012), favorecendo a liberação da enzima no meio.

#### 2.4 Reatores do tipo Tanque Agitado e *Airlift*

A produção de enzimas é um dos bioprocessos mais estudados, principalmente devido sua importância industrial na síntese de outros compostos, como os farmacêuticos, alimentícios e biocombustíveis (ELSAYED et al., 2019). Dessa forma, o estudo dos diferentes tipos de biorreatores é fundamental na produção de enzimas microbianas. Os biorreatores mais indicados na produção de biomoléculas por fermentação submersa a partir de microrganismos, são os do tipo tanque agitado (STR), coluna de bolha e *airlift* (RAHIMI et al., 2018). Os parâmetros que mais influenciam em processos aeróbios são a agitação e aeração, pois podem favorecer a transferência de massa, aumento da biomassa, oxigênio dissolvido no meio (DO) e rendimento (SALMON et al., 2016). Contudo, para as escalas industriais, além das

características ideais para a produção de enzimas deve-se observar a economia geral do processo, dentre os quais o consumo de energia (SÄRKELÄ et al., 2019).

Os biorreatores de tanque agitado apresentam diferentes impelidores que promovem a agitação e por isso interferem na produção de enzimas microbianas. Esse fator também afeta o metabolismo microbiano, devido a tensão de cisalhamento nas células, bem como a velocidade de mistura em fluidos viscosos (GHOBADI et al., 2017). Entretanto, esses biorreatores por serem agitados mecanicamente possuem um maior consumo de energia se comparado ao agitado pneumaticamente, como os do tipo *airlift*.

Os biorreatores *airlift* são agitados por injeção de ar ou gás e por isso apresentam uma baixa taxa de cisalhamento e boa capacidade de mistura (TEC-CAAMAL et al., 2018). São indicados para a produção de biomassa, enzimas, proteínas e para o tratamento de efluentes (ZHANG et al., 2019). A produção de enzimas em reatores desse tipo, principalmente quando o oxigênio dissolvido favorece o crescimento celular, é bastante promissor. Por exemplo, o aumento de produtividade de xilanases por *Aspergillus terricola* comparado ao reator tanque agitado, foi relatado por Micheli et al., (2019). Outro fator importante é a faixa operacional em diferentes vazões, isso foi observado por Yen e Liu (2014). Eles concluíram que o aumento da produção de óleos por *Rhodotorula glutinis* foi associado a maior taxa de aeração (2,5 vvm). Segundo Bertollo et al., (2017), o aumento de oxigênio dissolvido foi melhor para reator *airlift* se comparado ao tipo coluna de bolha convencional.

## **2.5 Aplicação das esterases**

### **2.5.1 Indústria de Alimentos**

Na indústria de alimentos aplica-se na modificação de lipídeos, hidrólise da gordura do leite, maturação de queijos, produção de margarina de baixo valor calórico (KOURIST; BRUNDIEK; BORNSCHEUER, 2010; MIETTINEN et al., 2013). A aplicação dessas enzimas torna-se viável devido a ausência de co-fatores, alta enantiosseletividade, estabilidade e atividade em solventes orgânicos (BORNSCHEUER, 2002).

A síntese de esterases por bactérias lácticas contribuiu para formação de éster etílico que auxiliam na maturação de queijo do tipo Camembert (HONG et al., 2018). Outra abordagem importante foi relatada por Gao et al., (2017), onde as esterases produzidas por *Lactobacillus plantarum*, favoreceram a produção de compostos aromáticos no pescado,

importantes para aceitação sensorial. Dang et al.,(2018) codificaram esterases do genoma de *Saccharomyces cerevisiae* e concluíram que a alta atividade da enzima estava diretamente relacionada a produção de aromas frutados em bebidas alcoólicas fermentadas.

### **2.5.2 Degradação de materiais poluentes**

Algumas bactérias e fungos possuem a capacidade de colonizar superfícies de resíduos plásticos, como os poliuretanos. Os fungos, em maioria, são os mais reportados na biodegradação de plásticos, por exemplo: *Rhizopus delemere*, *Penicillium*, *Rhizopus arrizus* e *Fusarium* sp. (BHARDWAJ; GUPTA; TIWARI, 2013). Esses materiais podem ser despolimerizados por enzimas microbianas, como as esterases, lipases (atuam nas ligações éster) e proteases (ligações amida) (MATSUMIYA *et al.*, 2010; HOWARD, 2011). Esse processo torna-se mais atraente do que os químicos, pois ocorre em temperaturas moderadas, sem uso de catalisadores químicos, gerando menos poluentes (MAGNIN *et al.*, 2019).

Com isso, alguns fatores devem ser considerados para degradação enzimática como as características da própria enzima e do plástico (estrutura química, solubilidade, hidrofobicidade e peso molecular). Os poliésteres alifáticos, são exemplos de materiais sintéticos que possuem algum grau de biodegradabilidade. Os plásticos biodegradáveis podem ser degradados em oligômeros, dímeros e monômeros de baixo peso molecular, os quais podem ser usados na síntese de outros plásticos (TOKIWA *et al.*, 2009).

Outras aplicações são conhecidas por seu papel na degradação de materiais naturais e poluentes industriais, como resíduos de cereais e alguns produtos químicos (PANDA; GOWRISHANKAR, 2005). Segundo Kadri *et al.*, (2018) as esterases podem auxiliar na biorremediação, pois o cultivo da bactéria *Alcanivorax borkumensis* em meio composto por hexadecano favoreceu a produção da enzima com atividade enzimática de 57,5 U/mL. Algumas esterases podem hidrolisar poliésteres, como a produzida pela levedura *Pseudozyma antarctica* que foi capaz de degradar filmes plásticos produzidos por poli - butileno succinato (SATO *et al.*, 2017).

### **2.5.3 Indústria Química e Farmacêutica**

Esterases são capazes de atuar como biocatalisadores intermediários em reações químicas. Sendo importantes devido suas características de químio-, regio-, e/ou estereosseletividade. São reportadas na síntese de formas biologicamente ativas de vários produtos farmacêuticos, como Naproxen (anti-inflamatório), sintetizado por esterase NP de *Bacillus subtilis* (STEENKAMP; BRADY, 2008). Esterase recombinante foi caracterizada como um eficaz biocatalisador na síntese do composto quiral precursor do fármaco Pregalina (XU et al., 2015).

A esterase produzida por *Pseudomonas oryzihabitans* obteve maior desempenho como biocatalisador de álcoois secundários, pois não houve a necessidade de uso de co-fatores (WANG et al., 2018). Para síntese de alguns ésteres de cadeia curta relacionados a produção de aromas, as esterases são importantes nas reações de esterificação e transesterificação (GAO et al., 2016). Na indústria de cosméticos as esterases atuam nas reações de esterificação, para modificação de compostos naturais em ingredientes ativos (ANTONOPOULOU et al., 2016).

## 2.6 Purificação e caracterização de esterases

As etapas para purificação de enzimas são necessárias de acordo com o grau de pureza exigido para sua aplicação industrial. Em certos casos, essas enzimas estão concentradas em extrato fermentativo ou extremamente puras (homogeneidade proteica). Existem muitas técnicas para a purificação das esterases, tais como cromatografia (exclusão, troca iônica, interação hidrofóbica e afinidade), extração líquido-líquido, concentração (sais e solventes orgânicos) e eletroforese (BON; ANTONIETA; CORVO, 2008).

Os procesos fermentativos produzem diferentes tipos de extratos enzimáticos, portanto as técnicas de separação da enzima representam boa parte do estudo (TORRES et al., 2008). Esterase produzida por *Lactobacillus plantarum* foi purificada em duas etapas, utilizando a precipitação por sulfato de amônio e cromatografia de afinidade, a enzima foi concentrada em 8,4 vezes com atividade específica de 10,2 U/mg em substrato *p*-NP butirato (INMACULADA; ÁLVARO; FRANCISCO, 2013). Mazlan et al.,(2018) obtiveram a purificação de esterase recombinante (*Photobacterium* sp.) utilizando a cromatografia de afinidade em Ni<sup>2+</sup> - Sepharose e na segunda etapa a de troca iônica em Q-Sepharose, recuperando a enzima 2,88 vezes (2,53 U/mg). A caracterização de esterases produzida por *Kluyveromyces marxianus* e pré-purificada em coluna Phenyl Sepharose (cromatografia) e

apresentou estabilidade na faixa de pH 8 – 10 a temperatura de 80°C (MONTI et al., 2008). Esterase produzida por *Fusarium* sp. obteve grau de purificação de 41 vezes em relação ao extrato bruto. A proteína foi purificada por troca iônica e cromatografia de exclusão com peso molecular estimado em 76 kDa (LUO et al., 2015a).

Apesar de seu potencial na produção de enzimas, as esterases produzidas por leveduras ainda são pouco reportadas (ZHANG et al., 2014). *Ophiostoma piceae* produtora de esterase, foi expressa em *Pichia pastoris* para aumentar o rendimento catalítico da enzima, em seguida os extratos de proteína foram dessalinizados por diafiltração (ARNAU; VALERO, 2014). O fungo *Penicillium purpurogenum* produziu três esterases identificadas e caracterizadas por cromatografia de afinidade, sendo posteriormente expresso em *Pichia pastoris* e sua atividade enzimática foi relacionada a substrato lignocelulósico (OLEAS et al., 2017). A tabela 3 abaixo, descreve as principais características de esterases.

Tabela 3 – Parâmetros de pH, temperatura e peso molecular de esterases produzidas por microrganismo

<b>Microrganismo</b>	<b>pH/Temperatura de atividade</b>	<b>Peso molecular aproximado</b>	<b>Estabilidade pH/temperatura sais/íons/solventes</b>	<b>Referência</b>
<i>Pichia pastoris</i>	7,0/40 °C	40 kDa	–	(KAMBIRANDA et al., 2009)
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	5,5/40 °C	29 kDa	5,0/50 °C/Etanol	(SUMBY; GRBIN; JIRANEK, 2013)
<i>Pseudozyma sp</i>	8,0/60 °C	175 kDa	9,0/50 °C/Etanol e Metanol	(ALEX et al., 2014b)
<i>Fusarium sp.</i>	8,0/50 °C	76 kDa	6,0-12,0/40 °C/Mg <sup>2+</sup>	(LUO et al., 2015b)
<i>Zunongwangia profunda</i>	8,0/30 °C	30 kDa	7,0-10,0/40°C/Ba <sup>2+</sup> ,Mn <sup>2+</sup> K <sup>+</sup> ,Ni <sup>2+</sup> ,Mg <sup>2+</sup> ,Fe <sup>3+</sup> ,Ca <sup>2+</sup> ,Co <sup>2+</sup>	(RAHMAN et al., 2016)
<i>Aureobasidium melanogenum</i>	8,0/40 °C	60 kDa	8,0/40 °C/Mg <sup>2+</sup> , Li <sup>+</sup>	(CHEN et al., 2017a)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	7,0/48 °C	38 kDa	–	(OLEAS et al., 2017)
<i>Glaciozyma antarctica</i>	8,0/10 °C	27 kDa	5,0-9,0/10 °C/Ca <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	(HASHIM et al., 2018a)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	5,0/60 °C	45 kDa	4,5-7,5/60 °C/NaCl, KCl, MnCl <sub>2</sub> ,CuSO <sub>4</sub> ,FeCl <sub>3</sub> /DMSO,DMF, Butanol, Tolueno, Etanol, Metanol	(CESAR LEMES et al., 2018)
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	7,0 – 8,5/60 °C	30 kDa	8,5/55 °C/MnSO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> ,CaCl <sub>2</sub> , NaCl <sub>2</sub> /n-Hexano, Acetona	(CURCI et al., 2019)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Estudar a produção de esterases por *Aureobasidium pullulans* URM 7059 a partir da otimização do processo fermentativo utilizando o glicerol residual da produção de biodiesel como fonte de carbono, e posterior caracterização bioquímica da enzima.

#### 3.2 Objetivos específicos

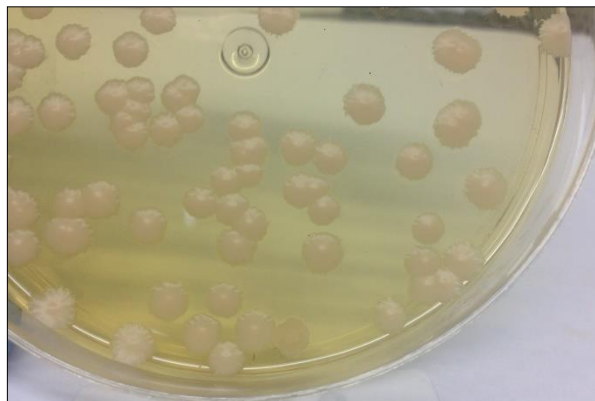
- Avaliar a capacidade da levedura *Aureobasidium pullulans* URM 7059 na produção de esterases por fermentação submersa;
- Utilizar o glicerol, um resíduo do biodiesel, como fonte de carbono para produzir a enzima lipolítica;
- Otimizar o meio de cultura, através de ferramentas de planejamento experimental, para a produção da enzima;
- Avaliar a produção de esterases em biorreatores do tipo Tanque Agitado e *Airlift*;
- Realizar o estudo das etapas de purificação e caracterização bioquímica de esterases.
- Aplicação da esterase produzida na degradação de polímero.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismo

A levedura *Aureobasidium pullulans* URM 7059 foi isolada do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.) por Holanda (2015) do Laboratório de Biotecnologia - LABIOTEC, da Universidade Federal do Ceará (UFC). A partir do estoque liofilizado, o microrganismo foi semeado em meio padrão - Caldo Batata Dextrose (CBD) ou Caldo Sabouraud (CS) – (HIMEDIA) para o crescimento e ativação e incubado a 28°C por 24h, sob agitação de 200rpm. Após esse período, foi transferido para placas de Ágar Batata Dextrose ou Ágar Sabouraud e novamente foi incubado a 28°C por 72 h. A incubação foi realizada em *shaker* orbital a 200 rpm e 28°C por 24h. Figura 3 mostra as características da levedura *Aureobasidium pullulans* URM 7059 em meio Ágar Sabouraud.

**Figura 3** – Levedura *Aureobasidium pullulans* URM 7059



Fonte: Elaborada pela autora.

### 4.2 Produção da esterase

A levedura *A. pullulans* URM 7059 foi inoculada em meio de cultura contendo: extrato de levedura (5 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (6 g/L), glicose (1 g/L), glicerol residual (1% m/m),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/L) e Tween 80 (0,4% v/v). A fermentação foi monitorada através da avaliação do consumo de glicose. Os experimentos foram realizados em *shaker* em Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio, incubados a 28°C e a 200 rpm por 48 h. A concentração de inóculo foi padronizada e ajustada para  $1 \times 10^7$  células/mL. A concentração de inóculo correspondeu a 10% (v/v) do volume final da fermentação. As amostras foram coletadas em intervalos regulares



(12 h) para determinar a concentração de biomassa e posteriormente centrifugadas (2700g, 15 min, 4°C) para determinar a atividade enzimática no sobrenadante.

#### **4.2.1 Atividade enzimática**

A capacidade síntese de esterases foi determinada através da hidrólise de p-nitrofenolbutirato (p-NPB) e p-nitrofenolcaprilato (p-NPC) em que uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu\text{mol}$  de p-NPB e p-NPC por minuto. Para determinar a atividade são utilizados 20  $\mu\text{L}$  da amostra (sobrenadante) e 980  $\mu\text{L}$  do substrato, sendo incubados a 40 °C (p-NPC) e 50 °C (p-NPB) durante 15 minutos. Depois deste tempo, 2 mL de acetona são adicionados para interromper a reação e a absorbância medida a 405 nm (GOMES; GONC, 2011). Os valores de atividade de esterase foram expressos em U/mL.

#### **4.2.2 Efeito da temperatura e pH para determinar a atividade enzimática**

Inicialmente, foram avaliados os parâmetros de pH, temperatura de atividade enzimática e tempo de fermentação (0-96h). A escolha foi baseada nas faixas de pH (5-9) mantendo fixo a temperatura de 30 °C e temperatura (30, 37, 40, 50, 60 °C) em pH 7,0. O ajuste de pH (5-9) para determinação da atividade enzimática foi realizado segundo a metodologia de Bacila e Tastaldi, (1973). O substrato contém 2,63 mM p-NPB ou p-NPC foi preparado em pH 7,0; 8,0 (tampão de Fosfato de sódio 0,025 M), pH 5,0; 6,0 (tampão Citrato de sódio 0,025 M), pH 9,0; 10,0 (tampão glicina 0,025 M) com 4% (v/v) de Triton X-100. Os ensaios foram realizados em *shaker* orbital com objetivo de obter as melhores faixas de trabalho que maximizem a atividade lipolítica sob os substratos p-nitrofenolbutirato (p-NPB) e p-nitrofenolcaprilato (p-NPC). A atividade enzimática foi determinada como descrito na seção 4.2.1.

#### **4.2.3 Otimização da composição do meio de cultura**

O estudo foi realizado com objetivo de analisar o efeito das diferentes concentrações de glicerol, extrato de levedura e sulfato de amônio na atividade enzimática de esterases. Essas variáveis foram mantidas do meio de cultura inicial, retirando-se a glicose,

mantendo apenas o glicerol como única fonte de carbono, fixando as concentrações de Tween 80 em 0,4 % (v/v) e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/L), com pH inicial de 5,5. O glicerol residual foi cedido pela Brasil Ecodiesel. O fatorial fracionado  $2^{3-1}$ , incluindo 3 repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios. Os valores foram gerados no *Software* Statística v 13.0 (Statsoft).

A partir dos bons resultados obtidos com o estudo do efeitos das variáveis, foram selecionadas as concentrações de glicerol (0,1% v/v), extrato de levedura (8 g/L) e sulfato de amônio (4g/L) que favoreceram o aumento da atividade enzimática. O planejamento fatorial completo (CCD) foi realizado para determinar as concentrações de milhocina (*corn steep liquor* – CSL) e extrato de levedura, com o propósito de substituir parcialmente ou totalmente a fonte de nitrogênio sintética na composição do meio de produção de esterases. CSL foi cedido pelo COPAM: Companhia Portuguesa de Amidos, SA (Portugal), cuja composição possui 75 g/L de carboidratos e 5 g/L de proteína. O experimento foi conduzido com duas variáveis em dois níveis ( $2^2$ ) incluindo 4 ensaios nas condições axiais e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. O planejamento foi gerado no *Software* Statística v 13.0 (Statsoft).

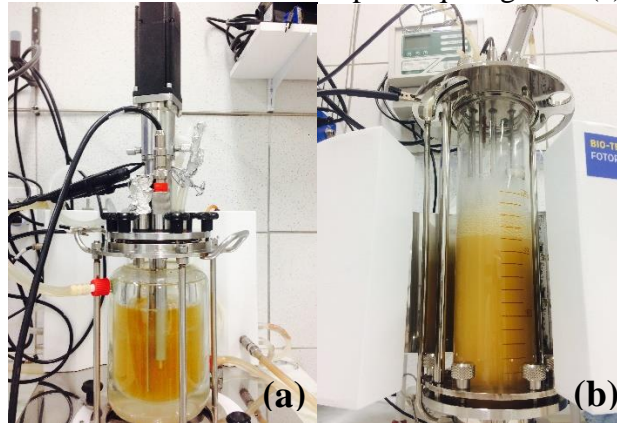
#### ***4.2.4 Produção de esterases por A. pullulans URM 7059 em biorreatores do tipo tanque agitado e airlift***

A levedura *A. pullulans* URM 7059 foi inoculada em meio de cultura otimizado contendo: extrato de levedura (8 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (4 g/L), glicerol residual (0,1% v/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/L) e Tween 80 (0,4% v/v). Os experimentos seguintes foram realizados em reator do tipo tanque agitado e *airlift* (Figura 4).

A produção de esterase foi avaliada a partir do biorreator do tipo tanque agitado (Tecnal, modelo Tecbio, volume de trabalho de 1,5 L) (800 mL), com temperatura controlada a 28° C, agitação a 200 rpm, pH inicial 5,5 com aeração (2 L/min). A produção da enzima no reator *Airlift* (Tecnal, BIO-TEC-FLEX, volume de trabalho de 2,0 L) manteve os mesmos parâmetros de pH, temperatura e inóculo inicial citados para o biorreator anterior. O estudo neste biorreator avaliou a influência das diferentes vazões de 2, 4, 6 e 8 L/min. O oxigênio dissolvido (DO%) e o pH foram medidos usando sensores (Mettler Toledo, Suíça). A concentração de células no inóculo para iniciar a fermentação foi padronizada e ajustada para  $2 \times 10^8$  células/mL, usando uma câmara de Neubauer (Marienfeld GmbH, Alemanha). O quantidade do inóculo correspondeu a 10% (v/v) do volume final. As amostras foram coletadas

em intervalos regulares e centrifugadas (2700g, 15 min, 4 °C) para obter a biomassa e o sobrenadante livre de células para determinação da atividade enzimática.

**Figura 4** – Biorreator de bancada do tipo tanque agitado (a) e Airlift (b)



Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.2.5 Determinação do consumo de glicerol

Consumo de glicerol durante a fermentação foi quantificado por HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência), modelo (Agilent 1260 infinity, Wilmington, Delaware, EUA), equipado com um detector de índice de refração e de UV-visível e utilizando uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories Inc., Estados Unidos) e fase móvel contendo uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,005 mol/L. Os resultados foram expressos a partir de uma curva de calibração ( $R^2 = 0,999$ ) com a concentração de glicerol entre 1 a 20 g/L.

#### 4.2.6 Cálculo da produtividade de esterase

A produtividade de esterase (U/L.h) ao longo do tempo de fermentação para todas as configurações (*shaker* e biorreatores) foram calculados de acordo com a equação 1 abaixo:

$$\frac{\text{Atividade enzimática } \left(\frac{U}{L}\right)}{\text{tempo (h)}} \quad (1)$$

### 4.3 Pré-purificação das esterases

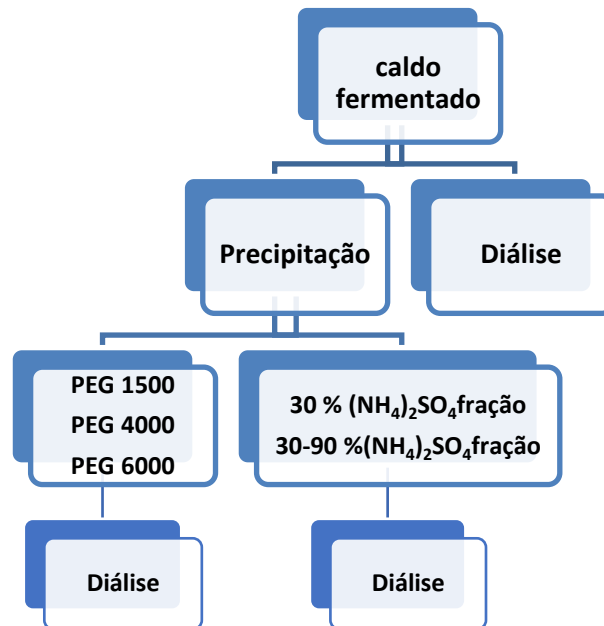
#### 4.3.1 Precipitação das esterases

##### 4.3.1.1 Esterase produzida por *Aureobasidium pullulans* URM 7059 em skaker

A esterase foi precipitada a partir do caldo de cultura livre de células em polietilenoglicol (PEG) a 50% (p/v). As soluções de PEG foram preparadas usando PEG 1500, 4000 e 6000 e adicionadas ao caldo fermentado na proporção de 1: 1 (v/v) e a 25 ° C e 4 ° C (Anexo A, Tabela 1). Após homogeneização, a mistura foi centrifugada (16000 g, durante 10 min a 4 ° C) e o precipitado foi dissolvido em PBS 50 mM (pH 7,0). Em seguida, essas soluções foram dialisadas usando uma membrana de acetato de celulose (corte de 12 kDa) contra o mesmo tampão por 4 h (25 ° C e 4 ° C).

Além disso, o sulfato de amônio na faixa de concentração de saturação de 30 a 90% também foi avaliado quanto à precipitação de esterase a partir do caldo de cultura livre de células. O sal foi dissolvido diretamente no caldo de cultura isento de células e, em seguida, deixado em repouso até 4 h a temperatura ambiente (25 ° C e 4 ° C). O precipitado de proteína foi coletado após centrifugação (10000 g, por 30 min a 4 ° C) e ressuspenso em PBS 50 mM, pH 7,0. Em seguida, essas soluções foram dialisadas usando uma membrana de acetato de celulose (corte de 12 kDa) contra o mesmo tampão por 4 h (25 ° C e 4 ° C). O conteúdo total de proteína (mg) foi determinado para cada fração pelo método de Bradford (1976) e atividade de esterase (U/mL) foi determinada como descrito na seção 4.2.1. Atividade específica (U/mg), atividade total (U), rendimento (%) e o fator de purificação também foram calculados. O fluxograma das precipitações estão descritos na Figura 5.

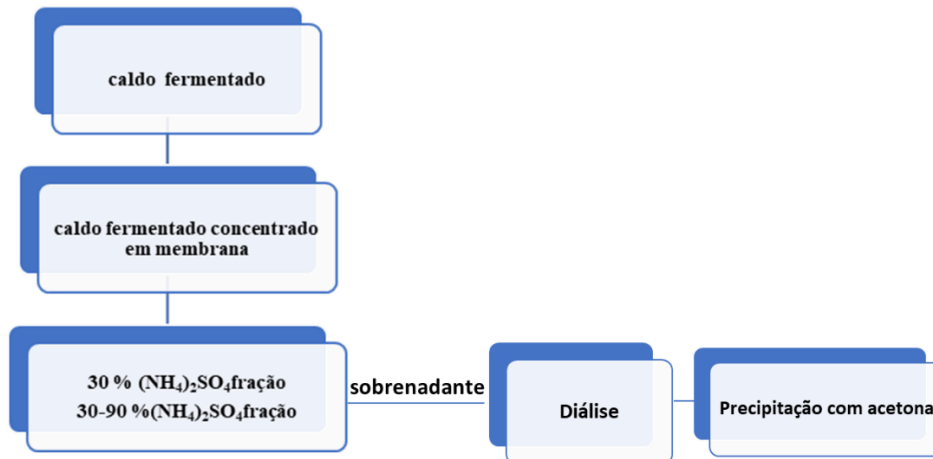
**Figure 5** – Fluxograma da precipitação de esterases utilizando diferentes protocolos



#### 4.3.1.2 Esterase produzida por *Aureobasidium pullulans* URM 7059 em Biorreatores

O caldo fermentado insento de células (8,5 L) de esterase produzido em biorreator *airlift* foi concentrado para um volume de 250 mL por ultrafiltração em membrana de corte de 10 kDa (Tecnal) a 25 °C. O caldo de cultura foi concentrado e precipitado em sulfato de amônio (30 e 90% p/v) a 25 °C. Portanto, duas fases diferentes foram avaliadas: sobrenadante e precipitado. A proteína foi coletada após centrifugação (10000 g, por 30 min a 4 ° C) e o precipitado foi dissolvido em PBS 50 mM pH 7,0. Em seguida, essas soluções foram dialisadas usando uma membrana de acetato de celulose (corte de 12 kDa) contra o mesmo tampão por 4 h (25 °C). A fração sobrenadante foi coletada e precipitado com acetona. A evaporação da acetona e o precipitado de proteínas foram suspensos em Tris 0,1 M (pH 8,0). O conteúdo total de proteína (mg) foi determinado para cada fração pelo método de Bradford (1976) e atividade de esterase foi determinada como descrito na seção 4.2.1. Atividade específica (U/mg) e atividade total (U) também foram calculados. O fluxograma das precipitações estão descritos na Figura 6.

**Figure 6** – Fluxograma da precipitação de esterases utilizando diferentes protocolos



### 4.3.2 Caracterização parcial das esterases

#### 4.3.2.1 Eletroforese e zimograma

A massa molar estimada das esterases foram determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio a 12,5% (SDS-PAGE) sob condições de desnaturação a pH 8,8 e gel *stacking* a 4% (pH 6,8). A eletroforese foi realizada em 120 mV e 30 mA usando equipamento MiniV (Ge Healthy Care). O gel foi corado com nitrato de prata (0,1% p/v) (PlusOne™ Silver Staining Kit, Protein, GE Healthy Care). Foi utilizado o marcador Bench Mark™ Protein Ladder (Invitrogen, EUA) variando o peso molecular de 10 a 220 kDa.

O zimograma foi realizado utilizando gel obtido por eletroforese (gel de poliacrilamida nativa) sem adição de SDS e β-mercaptoetanol. O gel foi lavado em Tris/HCl 50 mM (pH 8,0) por 30 min. Posteriormente, este gel foi testado quanto à atividade da esterase sob ágar cromogênico que foi preparado com substrato de tributirina a 2%, ágar a 2% (m/v), vermelho de fenol (0,01%), solução de CaCl<sub>2</sub> a 10 mM e pH 7,3. Posteriormente, foi incubada a 40 ° C por 20 h e a atividade foi observada a partir da revelação de faixa amarela clara, que corresponde a proteína (enzima) que hidrolisou o substrato (SINGH et al., 2006).

#### 4.3.2.2 Efeito do pH, temperatura e sais na estabilidade das esterases

Foi avaliada a estabilidade da esterase parcialmente purificada (precipitada por sulfato de amônio 30-90%) exposta por 2 h a diferentes temperaturas variando de 10 a 80°C (GUO; YU; XU, 2017). Da mesma forma, a estabilidade da enzima para diferentes valores de pH a 4°C por 2 h também foi estudada (LIU et al., 2008). Para esse efeito, tampão de citrato 50 mM (pH 4,0 - 5,0), tampão fosfato de potássio 50 mM (PBS) (pH 6,0 - 8,0) e tampão Glicina-NaOH 50 mM (pH 9,0).

Além disso, o efeito de diferentes sais na estabilidade da enzima foi testado com solução 5 mM dos seguintes íons:  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ . A enzima foi incubada a 4 °C em pH 7,0. Todos os resultados da atividade de esterase nesta seção foram avaliados usando p-NPC como substrato por 1 h (DIVAKAR; SURYIA PRABHA; PENNATHUR, 2017). A reação enzimática incubada a 4°C foi utilizada como referência para atividade relativa definida como 100%.

#### 4.3.2.3 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram determinados com a esterase parcialmente purificada em concentrações variando de 0,25 - 5 mM usando p-NPC e p-NPB como substrato. A reação foi realizada nas mesmas condições descritas no item 4.2.1. O  $K_m$  e  $V_{max}$  foram estimados de acordo com a equação de *Michaelis – Menten*.

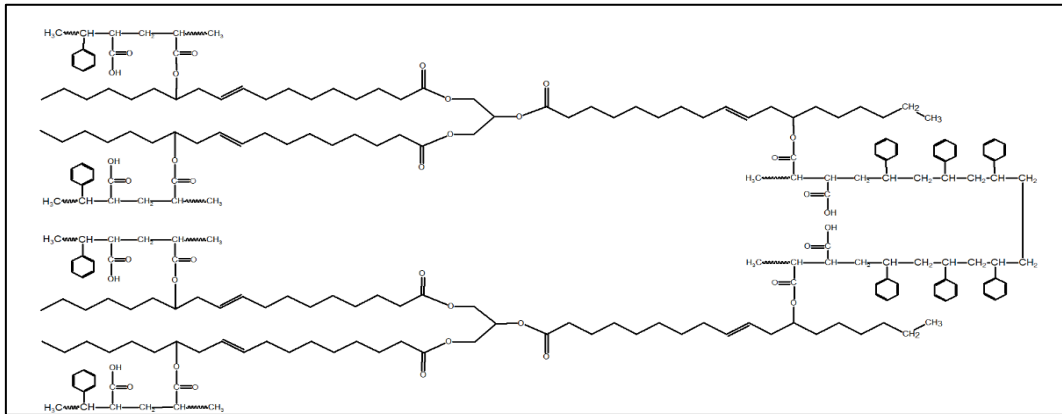
## 4.4 Aplicação das esterases

As esterases testadas foram Est-1 (produzida em *shaker*) e Est-2 (produzida em *Airlift*). A mistura para reação enzimática foi preparada a partir do caldo de cultura de esterase (10 mL) e polímero MACO-St (2 mL). A reação foi realizada em *shaker* (200 rpm) a 25 °C por 14 dias. O polímero MACO-St (Copolímero maleato de óleo de mamona-estireno) foi cedido pelo Laboratório de Núcleo de Análise e Desenvolvimento de Processos da Universidade Federal do Ceará (UFC). A estrutura molecular do polímero está representado na Figura 7.

As estruturas moleculares foram analisadas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). As análises foram realizadas usando o Cary 630 FTIR (Agilent, EUA), equipado com um acessório de medição de cristal de diamante ATR. Os espectros de IV foram coletados na região entre 400 e 4000  $cm^{-1}$  de comprimento de onda

usando a resolução espectral de  $1 \text{ cm}^{-1}$ . Todas as amostras foram aplicadas diretamente no espectrômetro sem qualquer tratamento prévio.

**Figura 7** – Estrutura molecular do polímero MACO-St



Fonte: MAIA e FERNADES (2019).



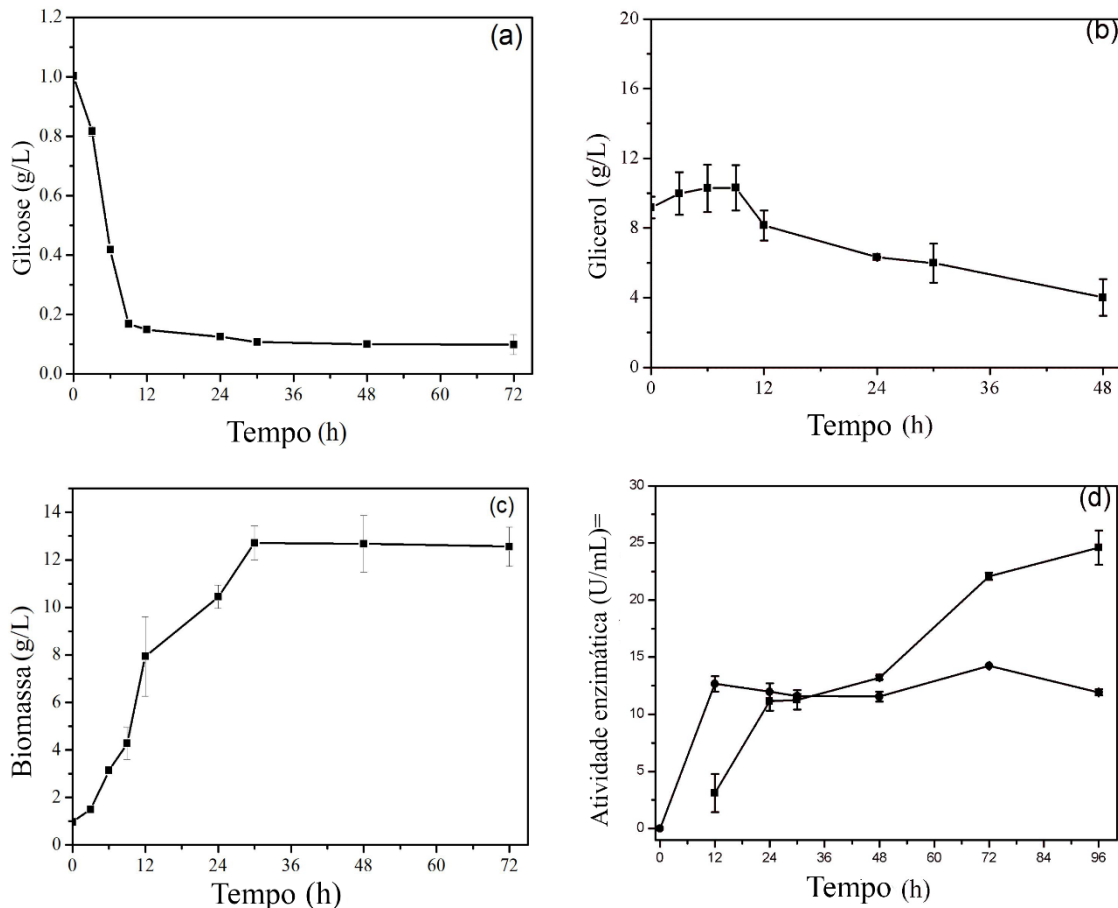
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Esterase produzida por *A. pullulans* URM 7059

O percurso da fermentação foi avaliado monitorando o consumo de glicose e glicerol. Após 12 h, a glicose estava totalmente esgotada e o microrganismo começou a consumir glicerol como fonte de carbono (Figura 8a e Figura 8b). Em relação à biomassa, a fase estacionária iniciou as 30 h com uma concentração de 12 g/L (Figura 8c) e a produção de esterase mostrou-se associada ao crescimento (Figura 8d). Alguns microrganismos são capazes de metabolizar o glicerol, uma molécula simples que produz concentrações de biomassa semelhantes às de outros açúcares comuns usados nas fermentações (ALMEIDA; FÁVARO; QUIRINO, 2012). Aqui, a substituição da glicose pelo glicerol reduziu os níveis de atividade da enzima para  $22,08 \pm 0,31$  U/mL (usando p-NPC) e  $14,25 \pm 0,08$  U/mL (usando p-NPB). Lemes et al., (2018) relataram que a esterase produzida por *A. pullulans* LABIOTEC 01 em um meio de cultura contendo águas residuais de moinho de azeitona foi de  $14,6 \pm 0,5$  U/mL (usando p-NPB) após 96 h de fermentação. Apesar da baixa atividade enzimática, é importante notar que, em escala industrial, a possibilidade de usar um resíduo como fonte de carbono pode ser crucial para a sustentabilidade do processo. De fato, aqui, usando meio com glicerol, foi possível obter uma atividade enzimática que, embora seja menor do que a obtida em um meio de glicose, ainda é maior que a atividade relatada por Lemes et al (2018). De acordo com os dados aqui analisados, pode-se concluir que o tempo de fermentação para os próximos experimentos será fixado em 48 h, além de utilizar apenas o glicerol como fonte de carbono para produção da esterase.

Os valores de atividade de esterase sobre os substratos (p-NPC e p-NPB) divergem devido as características de especificidade entre enzima e substrato. A preferência da enzima por cadeias de diferentes comprimentos é influenciada por dois fatores, um deles está relacionado a natureza dos aminoácidos que compõe o sítio ativo da enzima, e outro com a forma do sítio ativo de ligação (SANDOVAL, 2009). Isso está diretamente relacionado a forma como a esterase catalisa as reações e por isso elas apresentam diferentes valores de atividade, como pode-se concluir na Figura 8d.

**Figura 8** – Fermentação por *Aureobasidium pullulans* URM 7059 utilizando extrato de levedura (5 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (6 g/L), glicose (1 g/L), glicerol residual (1% m/m),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/L) e Tween 80 (0,4% v/v) em meio de cultura. Concentração de glicose (g/L) (a); Concentração de glicerol (g/L); Concentração de biomassa (g/L); Atividade da esterase usando diferentes substratos, como caprilato (●) e butirato (■). Os resultados correspondem à média de três medições  $\pm$  desvio padrão



Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.2 Seleção de temperatura e pH ótimo para atividade enzimática

Antes de otimizar o meio de cultura, o efeito do pH e da temperatura na atividade da esterase extracelular foi avaliada usando os substratos p-NPC e p-NPB, como mostrado na Tabela 4. A esterase produzida por *A. pullulans* URM 7059 mostrou boa atividade a pH neutro para ambos os substratos. Para p-NPC, as atividades mais altas foram detectadas em pH 7,0 e 9,0, enquanto para p-NPB as atividades mais altas foram encontradas em pH 7,0 e 8,0. Portanto, pH 7,0 foi selecionado para o ensaio enzimático para ambos os substratos. Da mesma forma, foi determinada a temperatura ótima para os ensaios de atividade enzimática com cada substrato. Para o substrato p-NPC a 40 °C obteve uma atividade de  $23,80 \pm 0,27$  U/mL, enquanto que para o p-NPB foi obtida uma atividade máxima de  $22,66 \pm 0,60$  U/mL a 50 °C.

No entanto, a atividade da esterase diminuiu 40% a 60 °C (p-NPB). Maester et al., (2016) mostraram uma perda de 20% da atividade a 60 °C e melhor atividade em torno de 45°C, caracterizando esterases com atividade em temperaturas amenas.

Camacho et al. (2009) relataram uma atividade máxima a 80 °C para faixa de pH de 6,0 a 7,5 para *Halobacterium* sp. Os resultados aqui obtidos mostram que a esterase produzida por *A. pullulans* URM 7059 não é termotolerante, uma vez que a atividade enzimática diminui acentuadamente a 60 °C. Por outro lado, a esterase produzida por *A. pullulans* LABIOTEC 01 exibiu um pH ideal a 5,0 e temperatura a 60 °C (Lemes et al., 2018), sendo mais termoestável que a esterase produzida no presente estudo por *A. pullulans* URM 7059. Quanto ao pH ideal, a esterase produzida por *A. pullulans* LABIOTEC 01 é mais ácida, com baixa atividade em pH maior que 7,0, enquanto a enzima aqui produzida foi considerada alta atividade para valores de pH maiores que 7,0. Dessa forma a esterase aqui produzida, obteve boa atividade em pH 7,0 a temperatura de 50 °C (p-NPB) e 40 °C (p-NPC).

Tabela 4 – Seleção de pH e temperatura para o ensaio enzimático de esterase usando os substratos de p-nitrofenil caprilato (p-NPC) e p-nitrofenil butirato (p-NPB). Os resultados correspondem à média de três medições  $\pm$  desvio padrão. 1: temperatura fixada a 30°C; 2: pH 7,0.

pH <sup>1</sup>	<i>p</i> -NPC (U/mL)	<i>p</i> -NPB (U/mL)
5	1,21 $\pm$ 0,01	0,80 $\pm$ 0,01
6	4,58 $\pm$ 0,06	3,02 $\pm$ 0,09
7	16,31 $\pm$ 0,26	20,72 $\pm$ 0,44
8	10,49 $\pm$ 0,32	21,33 $\pm$ 0,50
9	17,40 $\pm$ 0,20	19,47 $\pm$ 0,19
Temperatura (°C) <sup>2</sup>	<i>p</i> -NPC (U/mL)	<i>p</i> -NPB (U/mL)
30	16,31 $\pm$ 0,26	20,72 $\pm$ 0,44
37	19,43 $\pm$ 0,09	15,55 $\pm$ 0,20
40	23,80 $\pm$ 0,27	17,20 $\pm$ 0,80
50	9,09 $\pm$ 0,14	22,66 $\pm$ 0,60
60	5,17 $\pm$ 0,03	3,66 $\pm$ 0,09

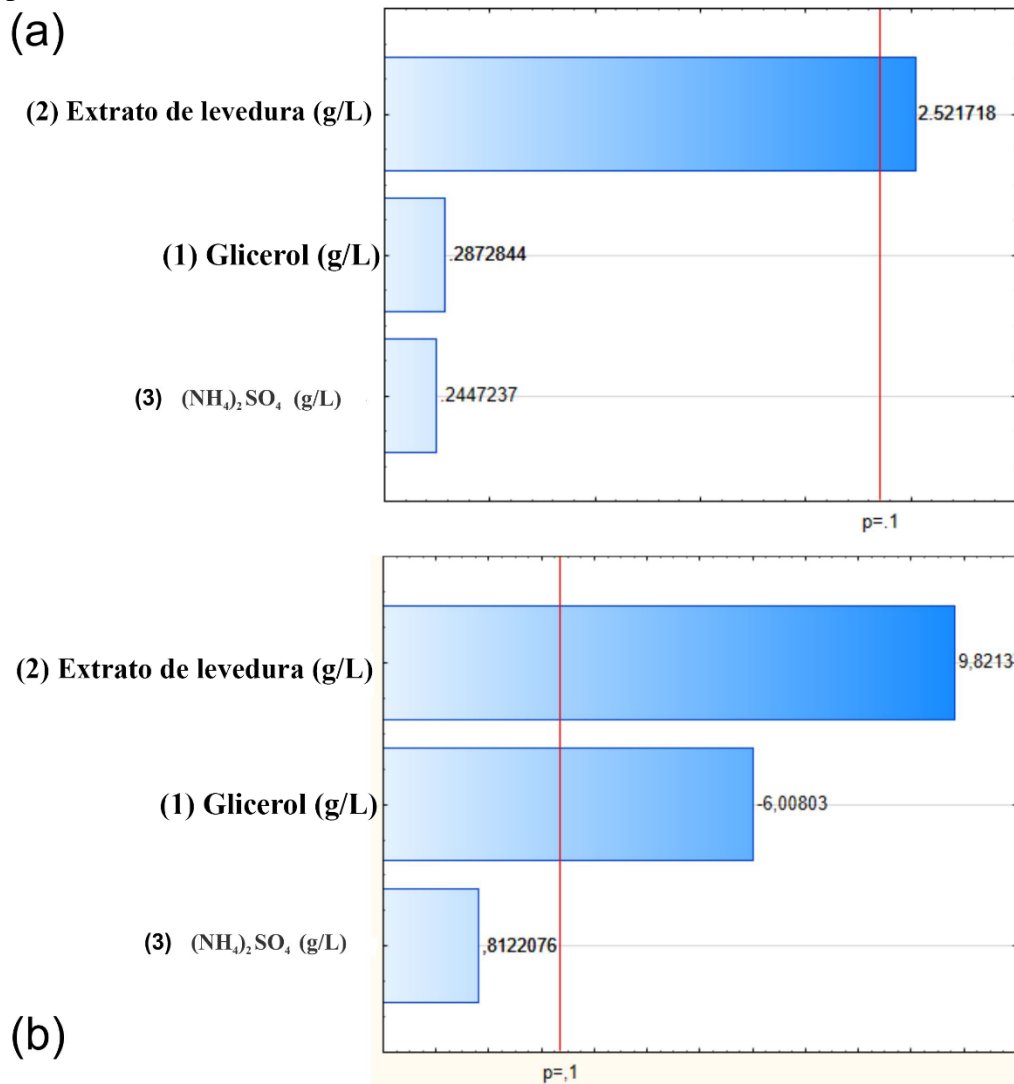
Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.3 Otimização da composição do meio de cultura para produção de esterases

Os resultados apresentados na Tabela 5 (planejamento fatorial fracionado) evidenciaram que *A. pullulans* URM 7059 é um bom produtor de esterase devido aos altos

valores de atividade obtidos mesmo na ausência de glicose. O efeito das fontes de carbono (glicerol) e nitrogênio (extrato de levedura e sulfato de amônio) na atividade enzimática é apresentado na Figura 9.

**Figura 9** – Efeito das fontes de nitrogênio e carbono na atividade da esterase produzida por *Aureobasidium pullulans* URM 7059. A atividade enzimática foi avaliada utilizando os substratos caprilato (a) e butirato (b). Os resultados correspondem à média de três medições  $\pm$  desvio padrão



Fonte: Elaborada pela autora.

O glicerol mostrou um efeito não significativo na atividade da esterase usando p-NPB (Figura 7a) e um efeito adverso usando substrato p-NPC (Figura 9b). O extrato de levedura apresentou efeito positivo e significativo, enquanto o efeito de sulfato de amônio não foi significativo ( $p < 0,1$ ). O extrato de levedura foi uma importante fonte de nitrogênio orgânica para a produção de esterase. Resultado semelhante foi descrito por Surya et al., (2015), ao qual

o extrato de levedura adicionado foi uma melhor fonte de nitrogênio, seguida pela fonte inorgânica, para o crescimento celular. De acordo com os resultados, baixas concentrações de glicerol (0,1% m/m) combinadas com altas quantidades de extrato de levedura (8 g/L) favoreceram o aumento da atividade da esterase. Muitos substratos lipídicos podem ser usados como fonte de carbono e indutores da produção de enzimas lipolíticas (ESAKKIRAJ et al., 2012). Morais et al. (2016) obtiveram atividade máxima utilizando o substrato butirato ( $11,9 \pm 0,10$  U/mL) em meio de cultura contendo 200 g/L de melaço de soja. Outros estudos relataram a melhoria do desempenho de microrganismos por meio de técnicas de engenharia genética, para aumentar a atividade enzimática (VALENZUELA et al., 2014). Corrêa et al. (2013) relataram que uma cepa recombinante de *Penicillium* sp. levou a 0,021 U/mL de esterase usando o caprilato como substrato, menor do que o obtido no presente estudo com o mesmo substrato. Apesar disso, a levedura *Aureobasidium pullulans* URM 7059 não é uma cepa mutante e mesmo assim exibiu uma promissora produção de esterase.

Tabela 5 – Planejamento fatorial fracionado ( $2^{3-1}$ ) para seleção das variáveis que afetam a produção de esterase por *Aureobasidium pullulans* URM 7059. Os resultados correspondem à média de três medições  $\pm$  desvio padrão

Ensaio	Glicerol (%)	Extrato de levedura (g/L)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	Atividade de esterase (U/mL)	
				p-NPC	p-NPB
1	0,1	2,0	8,0	$19,79 \pm 0,19$	$9,48 \pm 0,55$
2	1,9	2,0	4,0	$13,87 \pm 1,03$	$9,60 \pm 0,62$
3	0,1	8,0	4,0	$27,61 \pm 2,21$	$15,9 \pm 1,26$
4	1,9	8,0	8,0	$23,10 \pm 1,43$	$17,4 \pm 1,73$
5(C)	1,0	5,0	6,0	$20,41 \pm 0,33$	$16,48 \pm 0,26$
6 (C)	1,0	5,0	6,0	$20,05 \pm 0,02$	$16,26 \pm 0,48$
7 (C)	1,0	5,0	6,0	$19,62 \pm 0,41$	$17,52 \pm 0,24$

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados do planejamento composto central estão apresentados na Tabela 6. Os valores de atividade da esterase variaram de  $3,90 \pm 0,73$  a  $15,90 \pm 1,26$  U/mL usando p-NPB e  $3,40 \pm 0,88$  a  $27,00 \pm 2,21$  U/mL usando p-NPC. CSL (milhocina) foi uma fonte interessante de nitrogênio para a produção de esterase por *A. pullulans* URM 7059. Por exemplo, no ensaio 7, usando apenas 4 g/L de CSL sem nenhum extrato de levedura, foi possível obter uma boa atividade enzimática de  $21,1 \pm 0,93$  U/mL em p-NPC e um valor mais baixo para o substrato p-NPB ( $7,50 \pm 1,4$  U/mL). Por outro lado, uma maior atividade enzimática foi obtida no ensaio 2 ( $27,00 \pm 2,21$  U/mL e  $15,90 \pm 1,26$  U/mL) usando 8 g/L de extrato de levedura. No

entanto, analisando os resultados coletados na Tabela 5 e Tabela 6, é possível concluir que o CSL é desnecessário para a produção de esterase, sendo o extrato de levedura e a baixa quantidade de glicerol residual os fatores mais relevantes. A metodologia da superfície de resposta não foi aplicada aos dados apresentados na Tabela 6, pois o modelo ajustado não era estatisticamente significativo, pois o valor calculado ( $F_{5,5} = 2,0$ ) foi menor que o valor F tabelado ( $F_{5,5/0,05} = 3,45$ ) a 95% do nível de confiança. Portanto, a partir dos resultados obtidos a composição final do meio de cultura foi fixado em: 0,1(v/v) de glicerol residual, 8 g/L de extrato de levedura, 4 g/L de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , Tween 80 (0,4 % v/v) e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Tabela 6 – Planejamento composto central ( $2^2$ ) usado para otimizar a produção de esterase por *Aureobasidium pullulans* URM 7059. (C): ponto central. Os resultados correspondem à média de três medições  $\pm$  desvio padrão

Ensaio	CSL (v/v) %	Extrato de levedura (g/L)	Atividade de esterase (U/mL)	
			<i>p</i> -NPC	<i>p</i> -NPB
1	0,0	0,0	7,10 $\pm$ 0,94	3,90 $\pm$ 0,73
2	0,0	8,0	27,00 $\pm$ 2,21	15,90 $\pm$ 1,26
3	8,0	0,0	7,90 $\pm$ 1,10	6,50 $\pm$ 1,10
4	8,0	8,0	3,40 $\pm$ 0,88	8,80 $\pm$ 0,30
5	0,0	4,0	17,00 $\pm$ 2,30	10,90 $\pm$ 0,91
6	8,0	4,0	12,00 $\pm$ 0,85	4,50 $\pm$ 0,41
7	4,0	0,0	21,10 $\pm$ 0,93	7,50 $\pm$ 1,40
8	4,0	8,0	21,60 $\pm$ 0,32	14,60 $\pm$ 0,86
9 (C)	4,0	4,0	12,60 $\pm$ 1,0	7,60 $\pm$ 0,46
10 (C)	4,0	4,0	10,20 $\pm$ 0,53	8,80 $\pm$ 0,43
11 (C)	4,0	4,0	12,10 $\pm$ 2,10	8,60 $\pm$ 1,44

Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.4 Caracterização parcial de esterase produzida em *shaker*

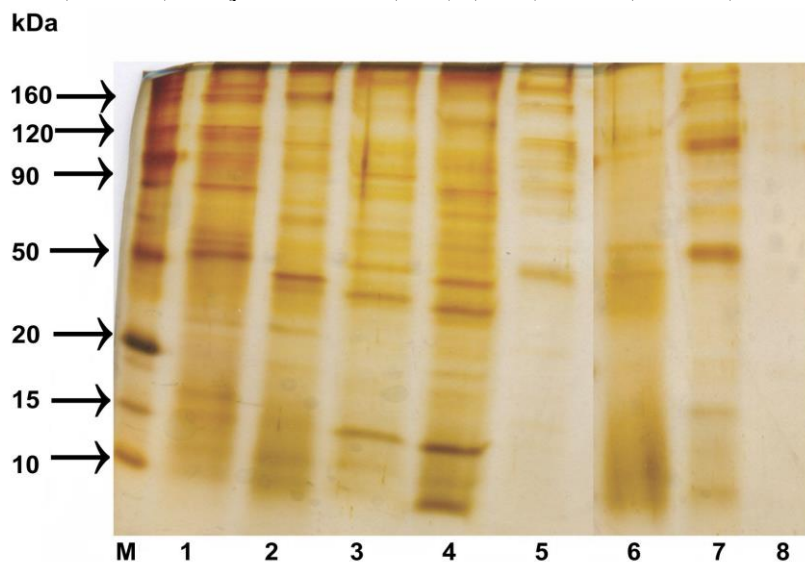
### 5.4.1 Precipitação da esterase

O grau de purificação da esterase pode ser observado pela Tabela 7 e os diferentes perfis de proteínas precipitadas a partir do caldo fermentado livre de células (48 h de fermentação) observa-se no gel SDS-PAGE ilustrado na Figura 10. O gel mostra as proteínas precipitadas de acordo com os diferentes protocolos PEGs (perfil 2, 3 e 4), diálise (perfil 5) e sulfato de amônio (perfil 6, 7 e 8). Os protocolos de precipitação usando as frações de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  e PEG, estão descritos na Tabela 7. De acordo com a atividade específica da enzima (U/mg) de

cada fração, é possível concluir que a precipitação foi mais seletiva para a esterase usando PEG 6000 ou  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  30/90, seguida do PEG 4000.

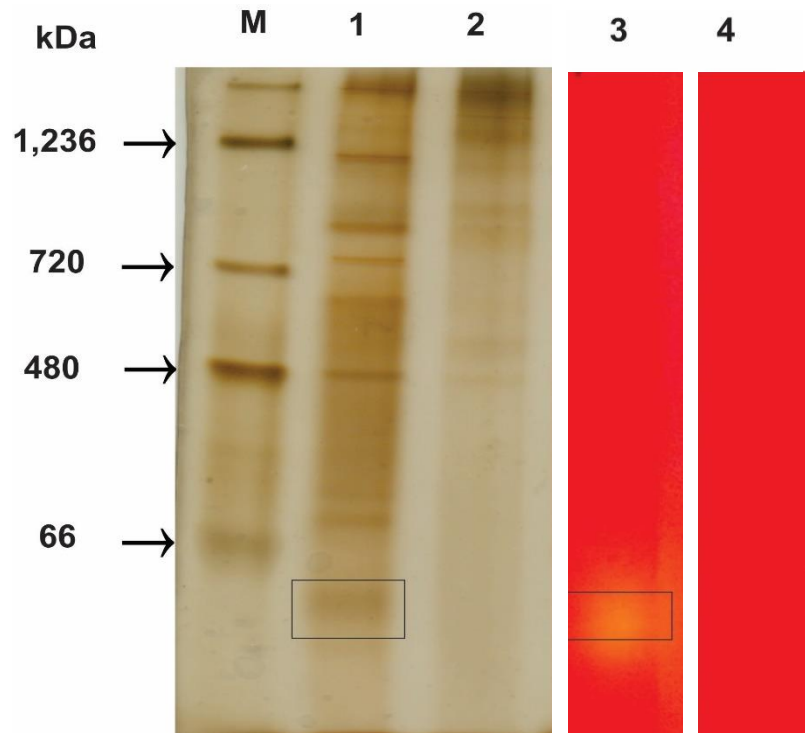
A eletroforese nativa e o zimograma foram realizados para identificação das bandas de proteínas ativas, através da precipitação com sulfato de amônio (perfil 7) e PEG 6000 (perfil 4). A Figura 11 (correspondente ao zimograma) mostra que a banda de atividade enzimática corresponde para uma massa molecular de aproximadamente 50 kDa. A baixa concentração de proteína no precipitado obtivo por PEG 6000 ( $0,36 \pm 0,07$  mg) pode explicar a ausência de banda ativa em gel de zimograma. Esse resultado é semelhante ao relatado para a esterase produzida por *Aureobasidium melanogenum* HN6.2, que apresentou massa molar de 60,2 kDa (CHEN et al., 2017b). A massa molar da esterase parcialmente purificada de *Achromobacter denitrifican* foi de 53 kDa (PRADEEP et al., 2015) e a de *Bacillus megaterium* foi de 55 kDa (ZHENG et al., 2017). Assim, a massa molar da esterase de *A. pullulans* URM 7950 está de acordo com vários relatórios anteriores.

**Figura 10** – SDS-PAGE gel que ilustra o perfil das proteínas precipitadas por diferentes protocolos. Marcador de peso molecular de proteínas (Perfil M); caldo bruto isento de células (Perfil 1); Proteína precipitada com: PEG 1500 (Perfil 2), PEG 4000 (Perfil 3), PEG 6000 (Perfil 4); sobrenadante do caldo bruto dialisado (Perfil 5); Proteína precipitada com: fração 30% (m/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Perfil 6), fração 30-90% (m/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Perfil 7); meio de cultura (Perfil 8)



Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 11** – Gel nativa PAGE para as etapas de precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Perfil 1) e PEG 6000 (Perfil 2). Zimograma (Perfil 3: proteínas precipitadas por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fração 30-90%; Perfil 4: proteínas precipitadas por PEG 6000) foi realizado para identificar a atividade das bandas de proteínas ativas



Fonte: Elaborada pela autora.



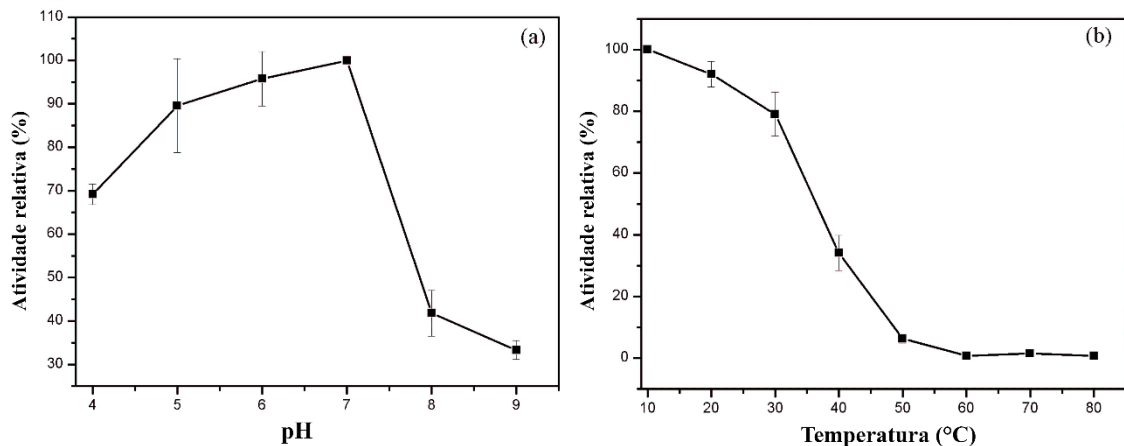
Tabela 7 – Precipitação de esterase precipitada por diferentes protocolos a 25 °C

Protocolos	Proteína total (mg)	Atividade total (U)		Atividade específica (U/mg)		Rendimento (%)		Fator de purificação	
		<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -NPC	<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -NPC	<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -NPC	<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -NPC
<b>Caldo fermentado</b>	13,19 ± 0,68	3640,00 ± 183,30	2225,00 ± 188,74	275,87 ± 1,92	169,22 ± 20,48	100,00	100,00	1,00	1,00
<b>PEG 1500</b>	1,48 ± 0,04	138,66 ± 10,26	111,33 ± 8,08	93,66 ± 8,65	75,24 ± 7,43	3,80 ± 0,17	5,04 ± 0,76	0,33 ± 0,03	0,45 ± 0,10
<b>PEG 4000</b>	1,00 ± 0,12	159,33 ± 10,06	90,66 ± 9,45	159,99 ± 24,52	90,11 ± 2,69	4,37 ± 0,05	4,11 ± 0,68	0,58 ± 0,09	0,53 ± 0,07
<b>PEG 6000</b>	0,36 ± 0,07	154,66 ± 20,36	114,4 ± 8,11	432,07 ± 87,67	324,45 ± 94,65	4,24 ± 0,26	5,17 ± 0,69	1,56 ± 0,30	1,93 ± 0,53
<b>Dialise</b>	38,37 ± 1,16	1616,80 ± 36,48	2476,8 ± 54,73	42,06 ± 4,16	68,17 ± 5,07	44,34 ± 3,81	117,71 ± 5,12	0,15 ± 0,01	0,40 ± 0,02
<b>Caldo fermentado</b>	19,90 ± 1,70	2770,00 ± 258,65	2080,00 ± 34,64	140,38 ± 23,76	104,93 ± 7,60	100,00	100,00	1,00	1,00
<b>Fração 30 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,51 ± 0,26	13,65 ± 2,95	10,75 ± 3,86	29,80 ± 10,00	22,06 ± 3,72	0,37 ± 0,09	0,47 ± 0,15	0,20 ± 0,04	0,13 ± 0,03
<b>Fração 30-90 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	2,80 ± 0,42	506,00 ± 3,46	1348,00 ± 68,23	182,92 ± 26,68	485,84 ± 59,26	13,92 ± 0,60	61,04 ± 8,16	1,31 ± 0,21	2,91 ± 0,62

#### 5.4.2 Temperatura, pH e concentração de sais na estabilidade da esterase

A esterase parcialmente purificada ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fração 30-90%) apresentou estabilidade em pH 7,0 na faixa de 5,0 a 7,0 (Figura 12). Esse resultado está próximo a outros estudos que relatam que a esterase é estável na faixa de pH de 6,0 a 8,0 (SHAKIBA et al., 2016; VAQUERO et al., 2016). Além disso, a enzima era instável a temperaturas superiores a 30 °C (Figura 12). A atividade relativa máxima da enzima foi alcançada na temperatura mais baixa (10 °C) estudada. Esses resultados são semelhantes aos relatados para uma esterase de *Fusarium* sp., que mostrou-se estável em pH 6,0 e temperaturas abaixo de 40 °C (LUO et al., 2015b). A esterase alcalina de *Lysinibacillus fusiformis* permaneceu estável a 30 °C (DIVAKAR; SURYIA PRABHA; PENNATHUR, 2017). De acordo com estudos anteriores, as esterases são estáveis de 30 °C a 40 °C, com uma diminuição da atividade residual a 50 °C (BASHEER et al., 2011). A esterase produzida por *A. pullulans* no presente estudo reteve 85% de sua atividade a 30 °C e perde progressivamente sua estabilidade a partir de 40 °C.

**Figure 12** – pH (a) e temperatura (b) de estabilidade de esterase parcialmente purificada produzida por *Aureobasidium pullulans* URM 7059. A atividade enzimática foi determinada utilizando o substrato caprilato (p-NPC). Os resultados correspondem à média de três medições ± desvio padrão



Fonte: Elaborada pela autora.

A presença dos íons metálicos diminuiu acentuadamente a atividade relativa da enzima (Tabela 8). Quando K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> e Zn<sup>2+</sup> foram adicionados à solução enzimática, observou-se uma inibição de 80%. Por outro lado, os íons metálicos Cu<sup>2+</sup> e Al<sup>3+</sup> levaram a valores de atividade enzimática de aproximadamente 90%, portanto, é possível que esses íons metálicos não interfiram na atividade da esterase. Dessa forma essa esterase, provavelmente

não exige a presença de co-fatores metálicos para catalisar suas reações, o que pode reduzir custos operacionais e também não interferir em processos de catálise durante sua aplicação. A esterase produzida pela levedura *Glaciozyma Antarctica* perdeu totalmente sua atividade na presença de  $Zn^{2+}$  (HASHIM et al., 2018b), enquanto a esterase de *A. pullulans* URM 7059 aqui estudada manteve 22% da atividade inicial. A esterase produzida por *A. pullulans* LABIOTEC 01 mostrou um leve aumento de atividade no presente de  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  and  $Mn^{+2}$  (LEMES et al., 2018).

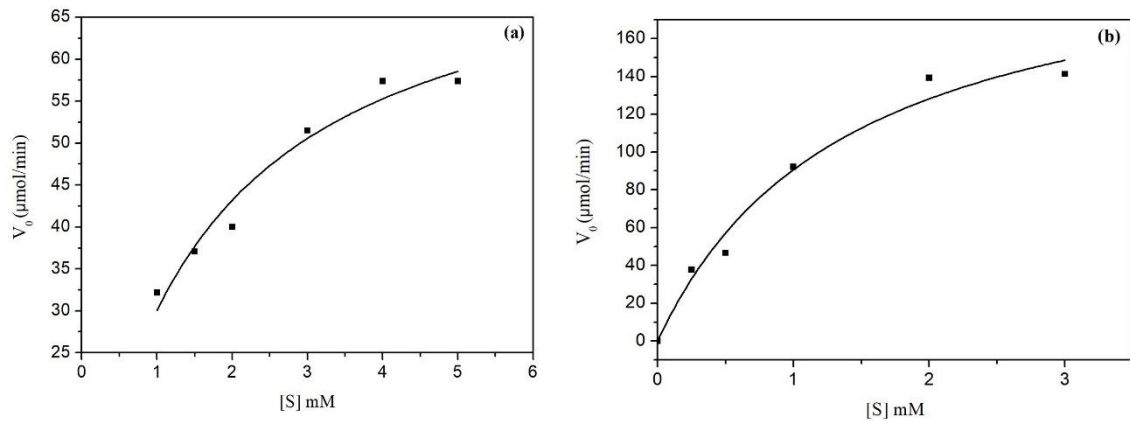
Tabela 8 – Efeito de diferentes íons metálicos na atividade da esterase produzida por *Aureobasidium pullulans* URM 7059. Os resultados correspondem à média de três medições  $\pm$  desvio padrão. Controle: ausência de íons metálicos

Metal	Concentração (mM)	Atividade enzimática relativa (%)
Controle	0,0	100,00
$K^+$	5,0	14,71 $\pm$ 1,95
$Mg^{2+}$	5,0	15,43 $\pm$ 1,54
$Na^+$	5,0	19,45 $\pm$ 1,90
$Zn^{2+}$	5,0	22,22 $\pm$ 1,19
$Ca^{2+}$	5,0	46,90 $\pm$ 5,48
$Fe^{3+}$	5,0	77,66 $\pm$ 8,80
$Ba^{2+}$	5,0	67,60 $\pm$ 1,12
$Al^{3+}$	5,0	82,18 $\pm$ 6,22
$Fe^{2+}$	5,0	62,43 $\pm$ 3,17
$Cu^{2+}$	5,0	91,84 $\pm$ 6,72

Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.4.3 Parâmetros cinéticos

O valor dos parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$  estimados foram de 1,4 mM e 218  $\mu\text{mol min}^{-1}$  para p-NPC (Fig. 13b), juntamente para o substrato p-NPB (Fig. 13a) foram de 1,55 mM e 76,76  $\mu\text{mol min}^{-1}$ , respectivamente. Li et al., (2018) produziram esterases de outras fontes e concluíram que tinham eficiência catalítica distinta. Outro estudo, relatou parâmetros cinéticos diversos entre diferentes deformações com valores de  $K_m$  na faixa de 0,437 e 1,363 mM (p-NPB) (OZCAN et al., 2009). Esterase produzida por levedura *Pichia pastoris* os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram de 1,34 mM e 22  $\mu\text{mol min}^{-1}$  (p-NPB), respectivamente (KAMBIRANDA et al., 2009). Neste trabalho, a esterase parcialmente purificada de *A. pullulans* URM 7059 apresentou maior afinidade para o substrato caprilato devido a melhores parâmetros cinéticos.

**Figura 13** – Parâmetros cinéticos de esterase parcialmente purificada

Fonte: Elaborada pela autora.

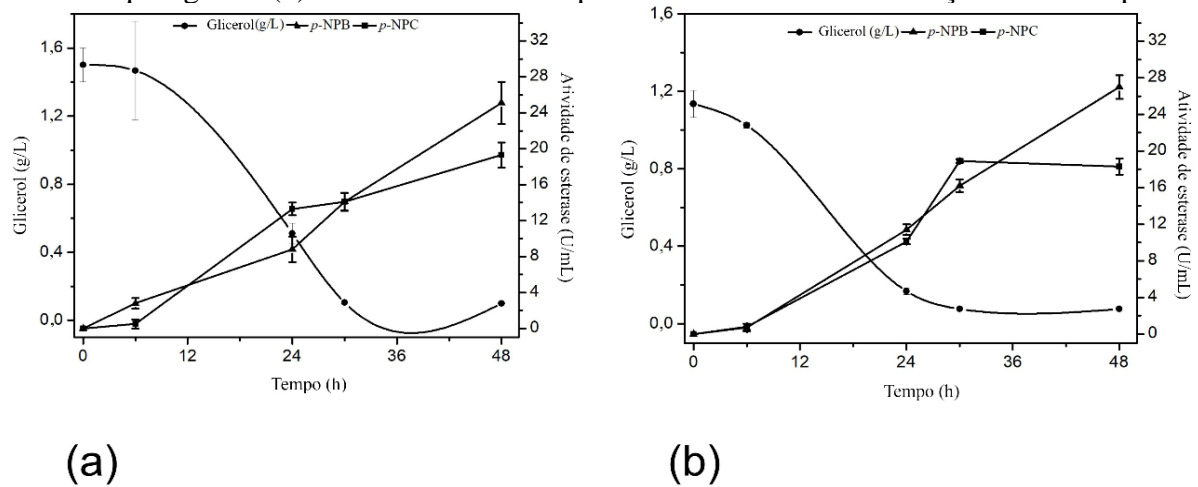
## 5.5 Produção de esterases em biorreatores

### 5.5.1 Produção de esterase em biorreator do tipo Tanque Agitado (STR)

Inicialmente, o processo de fermentação foi realizado em biorreator tanque agitado (Fig. 14b) e comparado aos resultados obtidos em *shaker* (Fig. 14a). A atividade de esterase foi  $25,1 \pm 2,34$  U/mL (p-NPC) e  $19,3 \pm 1,4$  U/mL (p-NPB), em *shaker*, durante 48 h. Os valores de atividade no reator tanque agitado (2 L/min), foram de  $18,3 \pm 0,9$  U/mL (p-NPC) e  $27 \pm 1,3$  U/mL (p-NPB). Godoy et al., (2014) descreveram a produção de esterase em *shaker* com valores de 1,8 - 11,3 U/mL (p-NPB) por *Candida rugosa* e 26,2 U/mL por *Thermomyces lanuginosus*. Hemmerich et al., (2014) avaliaram a produção de esterase em reator tanque agitado de 5 L, utilizando glicerol ( $12 \pm 1,2$  U/mL) e glicose ( $9,8 \pm 0,6$  U/mL) como fonte de carbono. A produtividade da esterase foi maior no STR em comparação aos shaker, os valores foram de 562 U/L.h e 395 U/L.h (p-NPB), respectivamente.

A diferença de volume reacional entre os processos não foram significativas para o metabolismo microbiano, sendo que o consumo de glicerol foi de 93% (Figura 12). A produção de esterase por *Aspergillus westerdijkiae* obteve atividade máxima de 19-24 U/mL, utilizando diferentes óleos vegetais (1%, v/v) para induzir a produção da enzima (CASTRO et al., 2018). Outros fatores influenciam nesses resultados como tipo de agitação, transferência de oxigênio e boa mistura (PINO et al., 2018).

**Figura 14** – Produção de esterase por *Aureobasidium pullulans* URM 7059 em *shaker* (a) e reator tanque agitado (b). Os resultados correspondem à média de três medições  $\pm$  desvio padrão

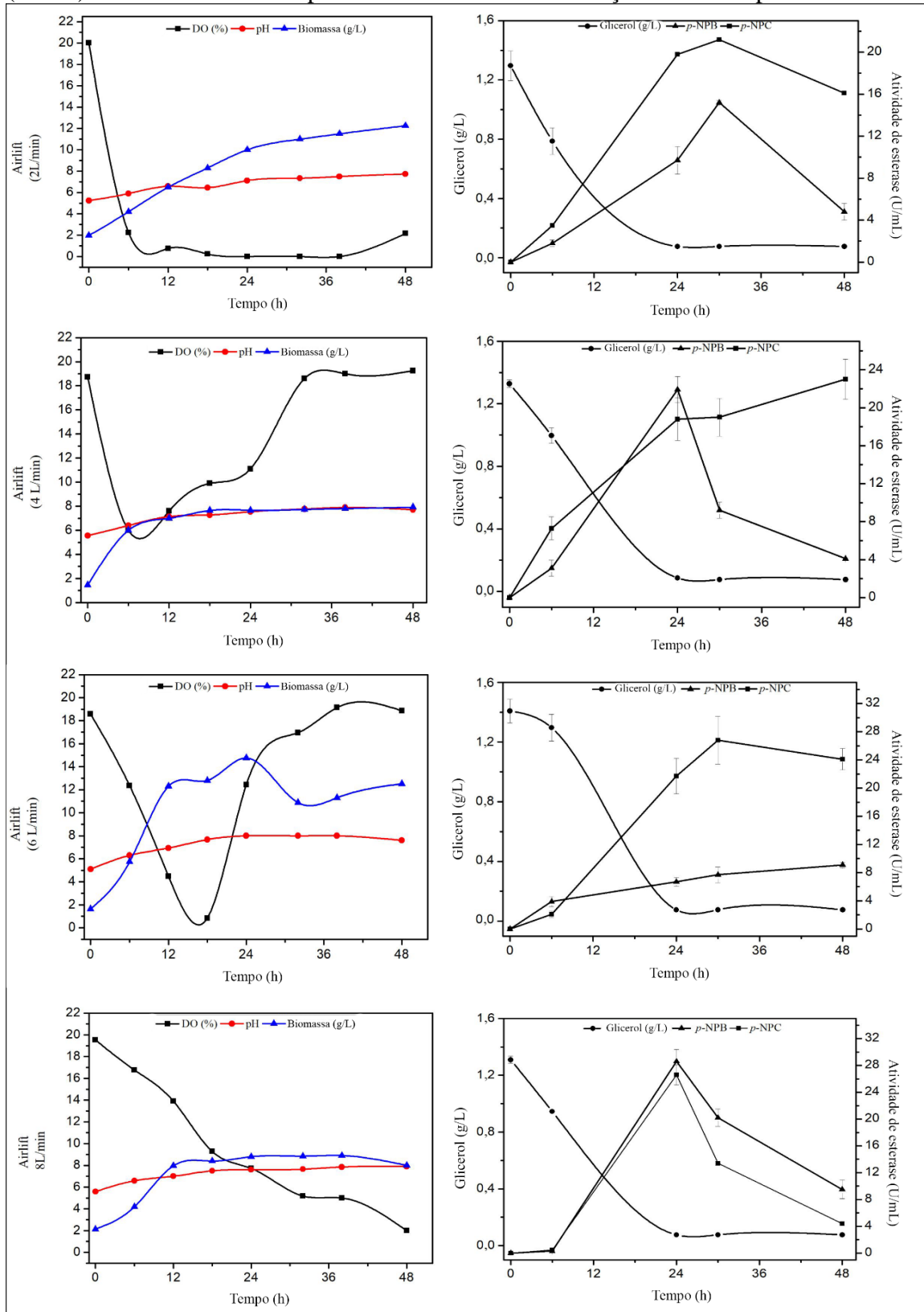


Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.5.2 Produção de esterase em biorreator do tipo Airlift

Diferentes taxas de aeração foram aplicadas em biorreator do tipo *airlift* para avaliar a produção de esterase, conforme descrito na Figura 15. A produção de esterases obteve bons valores em todas as escalas de aeração. No entanto, a atividade enzimática aumentou no fluxo de ar de 4 L/min e 8 L/min. Observou-se que a exaustão de oxigênio dissolvido (DO%) coincidiu com o aumento da biomassa e o início da produção de esterase. A atividade de esterase diminuiu após 24 h, provavelmente devido o consumo do glicerol. Assim, esses fatores contribuíram para uma melhor produtividade da enzima nesse tipo de reator (*airlift*) que os demais desempenhos, com 1191 U/L.h (p-NPB) e 1108 U/L.h (p-NPC). As atividades máximas obtidas com o fluxo de ar de 8L/min (Figura 15) foram de  $31,7 \pm 3,2$  U/mL (p-NPC) e  $31,2 \pm 0,5$  U/mL (p-NPB). Maldonato et al. (2015) relataram que a melhor produção de esterase por *Geotrichum candidum* foi de 19,24 U/mL a 2 L/min, usando reator *airlift*. Burkert et al. (2005) avaliaram o máximo na produção de lipase devido ao aumento da vazão do reator *airlift*.

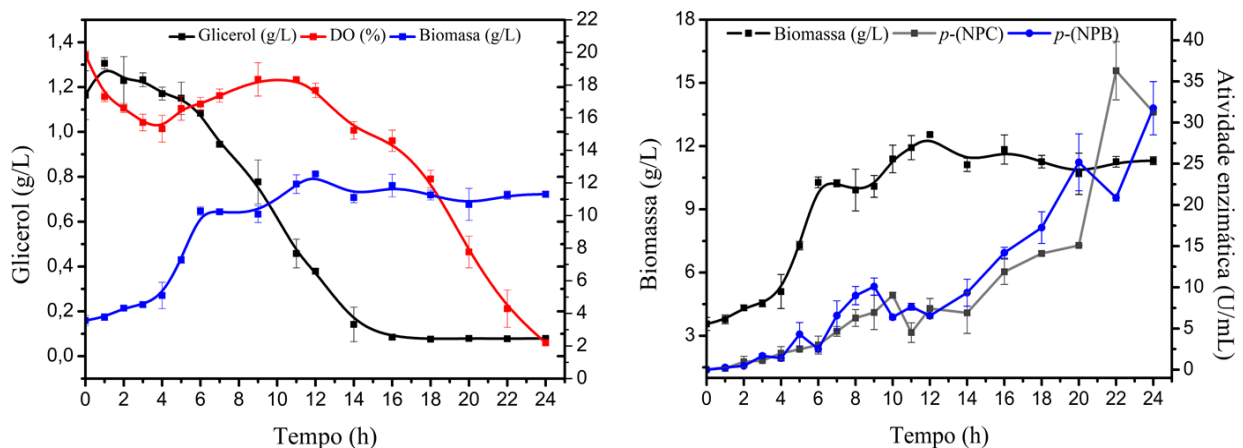
**Figura 15** – Resultados da atividade de esterase (U/mL), oxigênio dissolvido (DO%), pH, biomassa (g/L) e consumo de glicerol (g/L) em reator *airlift* com taxa de aeração de 2, 4, 6 e 8 (L/min). Os resultados correspondem à média de três medições  $\pm$  desvio padrão



Fonte: Elaborada pela autora.

A produção de esterase por *A. pullulans* URM 7059, aumentou em reator *airlift*, sugerindo que as atividades máximas estão relacionadas à maior vazão. A Figura 16 mostra a cinética de crescimento obtida a uma taxa de fluxo de ar de 8 L/min. A produção de esterase foi de 31 U/mL e a concentração de glicerol foi de 0,079 g/L durante 24 horas de fermentação. O maior consumo de glicerol foi associado à produção de esterase na fase estacionária e diminuição do oxigênio dissolvido. Jesus et al., (2017) concluíram que em meio viscoso o uso de biorreatores *airlift* pode ser uma alternativa para melhorar a taxa de transferência de oxigênio. Assim, a produção de esterase na fase estacionária torna o processo adequado em fermentações de sistema contínuo.

**Figura 16** – Cinética de crescimento da produção de esterases em biorreator *Airlift* (8 L/min) por *A. pullulans* URM 7059. Os resultados correspondem à média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão



Fonte: Elaborada pela autora.

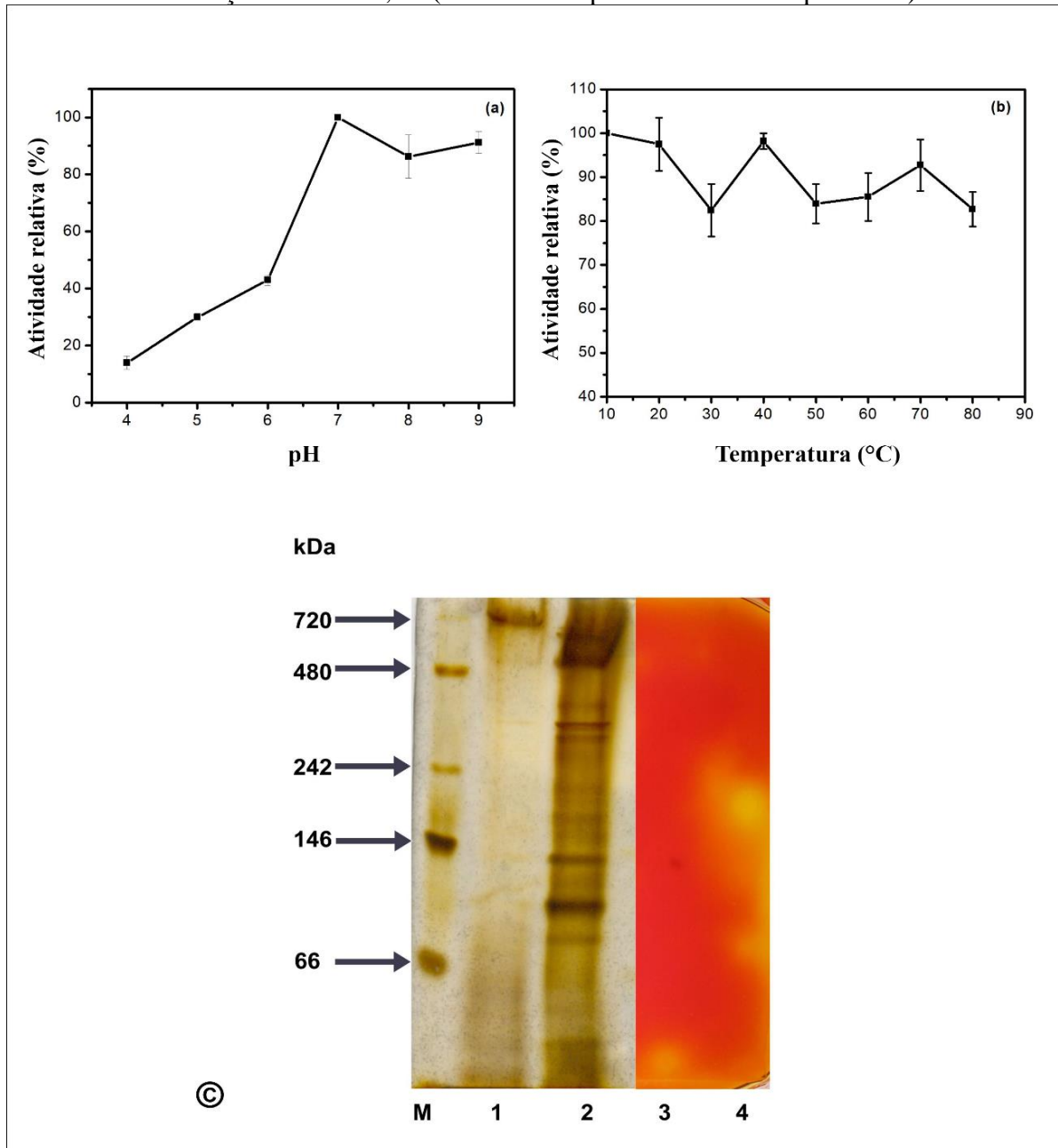
### 5.5.2.1 Caracterização parcial da esterase

A esterase produzida por *A. pullulans* URM 7059 em biorreator *airlift* (8L/min) foi parcialmente caracterizada como observado no gel nativo-PAGE (Figura 17c). Os protocolos de precipitação com  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  estão apresentados na Tabela 9. A massa molecular da esterase foi de aproximadamente 172 kDa. Além disso, outras duas esterases apresentaram bandas ativas no gel nativo, com massa molecular aproximada de 66 kDa e 40 kDa. As enzimas produzidas por *A. pullulans* URM 7059 a partir do biorreator *airlift* são da classe das esterases assim como a proteína obtida em *shaker*, devido sua ação enzimática em substratos de cadeia curta (Figura 11). Porém são esterases distintas, isso pode ser observado pelos seus diferentes pesos

moleculares (172 kDa, 66 kDa e 40 kDa), se comparados a esterase anteriormente produzida em *shaker* (50 kDa). Essa diferença na síntese da esterase, pode estar relacionada ao metabolismo da levedura. De fato, nessa configuração de biorreator, o microrganismo foi submetido a taxa de aeração maior que a do *shaker*, isso influencia na expressão da proteína, pois essa levedura é aeróbica e sua produção foi associada a fase estacionária de crescimento (Figura 15). Oleas et al., (2017) analisaram três esterases de *Penicillium purpurogenum*, determinada por zimograma, com massa molecular de 58 kDa, 38 kDa e 32 kDa. Apesar de poucos estudos relatarem sobre esterases de alto peso molecular, esse resultado foi observado a partir de esterase produzida por *Pseudozyma* sp. (175 kDa) (ALEX et al., 2014a).



**Figura 17** – (a) pH e (b) temperatura da estabilidade de esterase parcialmente purificada produzida por *Aureobasidium pullulans* URM 7059. A atividade enzimática foi determinada usando substrato caprilato (p-NPC). Os resultados correspondem à média de três medidas  $\pm$  desvio padrão. (c) gel e zimograma de Nativa-PAGE: proteínas precipitadas por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : fração 30 % (Perfil 1); fração 30%-90% (Perfil 2); Perfil 3: bandas de proteínas ativa da fração 30 % e Perfil 4: fração 30%-90%; M (marcador de peso molecular de proteínas)



Fonte: Elaborada pela autora.

A estabilidade da enzima em pH mostrou que a esterase é estável na faixa de pH 7,0 - 9,0, e abaixo de pH 6,0 a atividade da esterase foi reduzida em 40% (Figura 17a). Quanto à estabilidade a temperatura (Figura 17b), a enzima permaneceu com 98% a 40 °C e 90% da atividade na faixa de temperatura entre 50 °C-80 °C. A esterase produzida pelo fungo *Tuber*

*melanosporum* foi estável a 54 °C (CAVAZZINI et al., 2017). De fato, as termoenzimas microbianas possuem importantes aplicações nas indústrias de biocombustíveis, alimentos e papel (KUMAR et al., 2019).

Tabela 9 – Etapas de precipitação da esterase extracelular produzida por *Aureobasidium pullulans* URM 7059

Etapas	fase	Proteína total (mg)	Atividade total (U)		Atividade específica (U/mg)	
			<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -NPC	<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -NPC
[ ] caldo fermentado	-	36,0	960,36±55,62	2040,18±126,41	26,75± 3,31	54,63 ± 3,84
30 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + acetona	sobrenadante	0,46	26,13 ± 1,43	30,15 ± 0,40	56,21 ±0,39	65,00 ± 3,9
30-90 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + acetona	sobrenadante	5,37	84,17 ± 7,03	76,92 ± 3,81	15,74 ± 2,0	14,35 ± 1,09

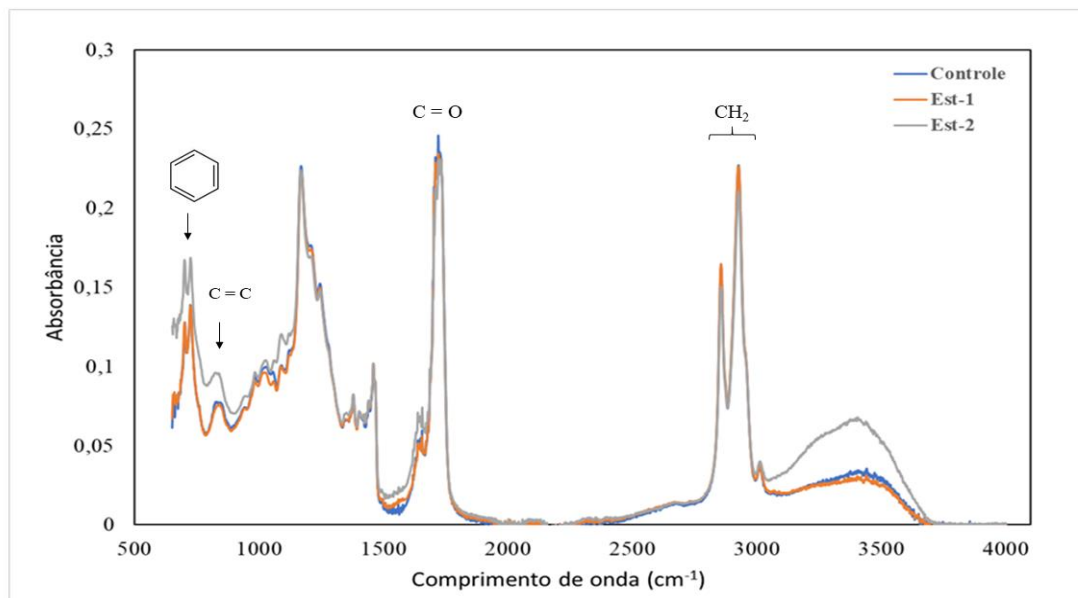
Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.6 Aplicação das esterases

O espectro de FTIR da aplicação de esterase (Est-1: *shaker* e Est-2: *airlift*) no polímero foi comparado aos espectros de controle do IR. (Figura 18). Os picos que correspondem às ligações éster (C = O) são 1720 cm<sup>-1</sup> que mostram a degradação parcial do polímero por Est-1 e Est-2. Em relação a Est-2, foi demonstrado uma redução dos picos 2840 cm<sup>-1</sup> e 2960 cm<sup>-1</sup> seguidos pelo aumento dos picos 698 cm<sup>-1</sup> e 757 cm<sup>-1</sup> correspondentes ao grupo CH<sub>2</sub> (anel benzeno no polímero), esse resultado pode estar relacionado a alterações conformacionais do polímero. Além disso, foram observados incrementos nos sinais nos picos 950,14 cm<sup>-1</sup>, devido o aumento dos grupos C = C, podendo indicar degradação do polímero na ligação entre os monômeros MACO e estireno. Assim, a Est-2 apresentou atividade sobre o polímero, este mecanismo pode contribuir para a degradação e reciclagem dos monômeros precursores de plásticos (SAIKA et al., 2019). Segundo Vargas-Suárez (2019) a capacidade de três enzimas (esterase, urease e protease) foi primordial para biodegradação de polímeros sintéticos.

Apesar de o polímero MACO-St não ser propriamente um plástico, sendo mais indicado como uma resina, esse teste indicou a capacidade da Est-2 na degradação do polímero em apenas 14 dias. O tempo de biodegração de filmes de fontes renováveis, sem ação enzimática, pode variar de 1 a 12 meses dependendo do tipo de material (YANG et al., 2020). O estudo da degradação de poluentes vem crescendo nos últimos 4 anos, e poucos trabalhos relatam o papel das esterases na hidrólise de resíduos (MAGNIN et al., 2019). Portanto, esses resultados, sugerem que as esterases produzidas nesse estudo são promissoras para testes futuros na degradação de outros compostos poliméricos.

**Figura 18** – Análise de Fourier espectrometria de infravermelho (FTIR) da ação de esterases sobre o polímero (MACO-St)



Fonte: Elaborada pela autora.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo comprovam a capacidade da levedura *Aureobasidium pullulans* URM 7059 na produção de esterases, utilizando o glicerol residual como única fonte de carbono. A partir das técnicas de planejamento experimental foi determinada a composição do meio de cultura, contendo glicerol (0,1% v/v),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (4 g/L) e extrato de levedura (8 g/L) em 48 horas de fermentação.

Em seguida, foram aplicadas diferentes etapas de precipitação das proteínas do caldo fermentado obtido em *shaker*, a maior recuperação da enzima ocorreu por sulfato de amônio nas concentrações 30/90%, com atividade específica de  $485,84 \pm 59,26$  U/mg (*p*-NPC) e peso molecular estimado de 50 kDa. Além disso, a esterase foi estável em pH 6,0 e 7,0 a temperaturas abaixo de 30 °C. Na presença de íons metálicos a atividade enzimática foi afetada na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , enquanto  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  não influenciaram a perda de atividade residual. Esses resultados indicam que a esterase não necessita de co-fatores metálicos. Os valores  $K_m$  e  $V_{\max}$  foram de 1,4 mM e  $218 \mu\text{mol min}^{-1}$  (*p*-NPC) enquanto para o substrato *p*-NPB foram de 1,55 mM e  $76,76 \mu\text{mol min}^{-1}$ , respectivamente. Esses parâmetros demonstraram a afinidade da enzima por substratos de cadeia curta, o que é característico das esterases.

A produção da enzima em escala de biorreatores, mostrou que a esterase produzida em *Airlift* (8L/min) obteve boa produtividade de 1191 U/L.h (*p*-NPB) e 1108 U/L.h (*p*-NPC) se comparado ao reator STR. A caracterização parcial por PAGE-gel dessa esterase, mostrou que 3 proteínas foram ativas em zimograma com peso molecular estimado de 172 kDa, 66 kDa e 40 kDa. O extrato enzimático produzido em reator *Airlift* foi aplicado em polímero (MACO-St), onde sua ação mostrou-se relevante na modificação da conformação da molécula em apenas 14 dias. Dessa forma, em projetos futuros essa nova esterase poderá atuar em diferentes áreas, como na biorremediação de plásticos ou em processos industriais que envolvam uma ampla faixa de temperatura (40 °C – 80 °C) e pH (7,0 – 9,0).

Por fim, esse estudo para produção de esterase microbiana, promoveu uma boa avaliação da capacidade produtora dessa enzima, desde o *shaker* a biorreatores de bancada. Esse fator pode auxiliar trabalhos posteriores em escala industrial e na seleção dessas enzimas lipolíticas, segundo seu interesse de aplicação.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, K. P.; SHILPKAR, P.; SHAH, M. C. Optimization study of esterase production by monocrotophos degrading Bacterium Bacillus subtilis KPA-1. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 2079–2087, 2016.
- ALEX, D. et al. Esterase Active in Polar Organic Solvents from the Yeast Pseudozyma sp. NII 08165. **Enzyme research**, v. 2014, p. 494682, jan. 2014a.
- ALEX, D. et al. Esterase Active in Polar Organic Solvents from the Yeast Pseudozyma sp. NII 08165. **Enzyme research**, v. 2014, p. 494682, 3 abr. 2014b.
- ALMEIDA, J. R. M.; FÁVARO, L. C. L.; QUIRINO, B. F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 48, 2012.
- ANTONOPOULOU, I. et al. Enzymatic synthesis of bioactive compounds with high potential for cosmeceutical application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 15, p. 6519–6543, 2016.
- ARNAU, C.; VALERO, F. Production of a Sterol Esterase From Ophiostoma piceae in Batch and Fed-Batch Bioprocesses Using Different Pichia pastoris Phenotypes as Cell Factory. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 5, p. 1012–1020, 2014.
- BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica**. Guanabara Koogan, 1973.
- BAO, X. et al. Optimization of fermentation conditions for marine Bacillus subtilis C5 producing esterase. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, v. 18, n. 6, p. 999–1003, 2012.
- BASHEER, S. M. et al. Lipase from marine Aspergillus awamori BTMFW032: production, partial purification and application in oil effluent treatment. **New biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 627–38, out. 2011.
- BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; DE LIMA, D. P. Glicerol: Um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 306–319, 2011.
- BERTOLLO, F. B.; LOPES, G. C.; SILVA, E. L. Phenol Biodegradation by Pseudomonas putida in an Airlift Reactor: Assessment of Kinetic, Hydrodynamic, and Mass Transfer Parameters. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 10, p. 398, 2017.
- BHARDWAJ, H.; GUPTA, R.; TIWARI, A. Communities of Microbial Enzymes Associated with Biodegradation of Plastics. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 575–579, 2013.
- BINHAYEEDING, N.; KLOMKLAO, S.; SANGKHARAK, K. Utilization of Waste Glycerol from Biodiesel Process as a Substrate for Mono-, Di-, and Triacylglycerol Production. **Energy Procedia**, v. 138, n.10, p. 895–900, 2017.
- BON, E. P. S.; ANTONIETA, F. M.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Portugal: Interciência, 2008.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases : classification , properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n.1, p. 73–81, 2002.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRESCIANI, F. R. et al. Production and activity of extracellular lipase from *Luteibacter* sp . **Annals of Microbiology**, n. 64, p. 251–258, 2014.

BURKERT, J. F. DE M. et al. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 61–67, 2005.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of applied microbiology**, v. 93, n. 6, p. 1020–1025, 2002.

CAMACHO, R. M. et al. Production and characterization of esterase and lipase from *Haloarcula marismortui*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 901–909, 2009.

CASAS-GODOY, L. et al. *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2: an efficient enzyme for the production of concentrates of docosahexaenoic acid ethyl ester. **Journal of biotechnology**, v. 180, n.7, p. 30–36, 2014.

CASTILLA, A. et al. Enzyme and Microbial Technology A novel thermophilic and halophilic esterase from *Janibacter* sp . R02 , the first member of a new lipase family ( Family XVII ). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 86–95, 2017.

CASTRO, F. F. et al. Production, purification, and characterization of a novel serine-esterase from *Aspergillus westerdijkiae*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 131–143, 2018.

CAVAZZINI, D. et al. A family of archaea-like carboxylesterases preferentially expressed in the symbiotic phase of the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7628, 9 dez. 2017.

CERQUEIRA, S. et al. Evaluation of substrates from renewable-resources in biosurfactants production by *Pseudomonas* strains. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 35, p. 5704–5711, 2010.

CESAR LEMES, A. et al. Integrated strategy for purification of esterase from *Aureobasidium pullulans*. **Separation and Purification Technology**, v. 209, n. 7, p. 409–418, 2018.

CHAHINIAN, H.; SARDA, L. Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. **Protein and peptide letters**, v. 16, n. 10, p. 1149–1161, 2009.

CHAROENPANICH, J. et al. A novel broad-temperature active and solvent stable esterase from a newly isolated *Bacillus aerophilus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, n. 10, p. 116–122, 2018.

CHEN, C.-C. et al. Production, purification, characterization and gene cloning of an esterase

produced by *Aureobasidium melanogenum* HN6.2. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 69–79, 2017.

CHEN, C. et al. Production, purification, characterization and gene cloning of an esterase produced by *Aureobasidium melanogenum* HN6.2. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 69–79, 2017b.

CHOI, Y. et al. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Purification and characterization of a new inducible thermostable extracellular lipolytic enzyme from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 124, p. 11–19, 2016.

CORRÊA, T. L. R. et al. Carboxyl ester hydrolase from *Penicillium expansum*: cloning, characterization and overproduction by *Penicillium griseoroseum*. **Journal of applied microbiology**, v. 115, n. 1, p. 114–24, jul. 2013.

CURCI, N. et al. Identification of a novel esterase from the thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. **Extremophiles**, v. 23, n. 4, p. 407–419, 3 jul. 2019.

DANK, A.; SMID, E. J.; NOTEBAART, R. A. CRISPR-Cas genome engineering of esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae* steers aroma formation. **BMC research notes**, v. 11, n. 1, p. 682, 2018.

DARVISHI, F. et al. High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. **New biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 756–60, out. 2011.

DAVID, G. F. et al. Glycerol bioconversion in unconventional magnetically assisted bioreactor seeking whole cell biocatalyst (intracellular lipase) production. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 111, p. 243–252, 2016.

DE, H.; LIU, H.; WANG, Z. Optimization of the fermentation conditions and substrate specificity of mycelium-bound ester hydrolases of *Aspergillus oryzae* Cs007. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 80, n. 1, p. 1–8, 2015.

DI FRANCESCO, A. et al. Reduction of acrylamide formation in fried potato chips by *Aureobasidium pullulans* L1 strain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 289, n. September 2018, p. 168–173, 2019.

DIMITRIOU, P. S. et al. Alpha/beta-hydrolases: A unique structural motif coordinates catalytic acid residue in 40 protein fold families. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 85, n. 10, p. 1845–1855, 2017.

DIVAKAR, K.; SURYIA PRABHA, M.; PENNATHUR, G. Purification, immobilization and kinetic characterization of G-x-S-x-G esterase with short chain fatty acid specificity from *Lysinibacillus fusiformis* AU01. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, n. March, p. 131–141, 2017.

DUAN, X. et al. Influence of different sugars on pullulan production and activities of  $\alpha$ -phosphoglucose mutase, UDPG-pyrophosphorylase and glucosyltransferase involved in pullulan synthesis in *Aureobasidium pullulans* Y68. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 4, p. 587–593, 2008.

ELAZZAZY, A. M.; ABDELMONEIM, T. S.; ALMAGHRABI, O. A. Isolation and

characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 4, p. 466–475, 2015.

ELSAYED, E. A. et al. Production of  $\beta$ -galactosidase in shake-flask and stirred tank bioreactor cultivations by a newly isolated *Bacillus licheniformis* strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101231, 1 jul. 2019.

ESAKKIRAJ, P. et al. Solid-state production of esterase using fish processing wastes by *Bacillus altitudinis* AP-MSU. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 370–376, 2012.

FANG, Z. et al. A Novel Esterase from a Marine Metagenomic Library Exhibiting Salt Tolerance Ability. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, n. 246, p. 771–780, 2014.

GAO, P. et al. Esterase activities of autochthonous starter cultures to increase volatile flavour compounds in Chinese traditional fermented fish (Suan yu). **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 1, p. S663–S672, 2017.

GAO, W. et al. A novel esterase from a marine mud metagenomic library for biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2016.

GHOBADI, N. et al. Characterizations of the submerged fermentation of *Aspergillus oryzae* using a Fullzone impeller in a stirred tank bioreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 1, p. 101–108, 1 jan. 2017.

GOMES, N.; GONC, C. Analytical Methods Optimization of a colorimetric assay for yeast lipase activity in complex. **Analytical Methods**, n. 4, p. 0–5, 2011.

GOSTINČAR, C. et al. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 549, 2014.

GUDIUKAITE, R. et al. Construction of a novel lipolytic fusion biocatalyst GDEst-lip for industrial application. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 799–815, 2017.

GUERRAND, D. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. **Ocl**, v. 24, n. 4, p. D403, 2017.

GUO, H. et al. Cloning, expression and characterization of a novel cold-active and organic solvent-tolerant esterase from *Monascus ruber* M7. **Extremophiles**, v. 20, n. 4, p. 451–459, 2016.

GUO, Y.; YU, X.; XU, Y. Cloning, expression and characterization of two thermostable esterases from *Aquifex aeolicus* VF5. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, p. 1–10, 2017.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 6, p. 782–98, 2009.

HASHIM, N. H. F. et al. Biochemical and structural characterization of a novel cold-active esterase-like protein from the psychrophilic yeast *Glaciozyma antarctica*. **Extremophiles**, n. 0123456789, p. 1–10, 2018a.



- HASHIM, N. H. F. et al. Biochemical and structural characterization of a novel cold-active esterase-like protein from the psychrophilic yeast *Glaciozyma antarctica*. **Extremophiles**, v. 22, n. 4, p. 607–616, 2018b.
- HEMMERICH, J. et al. Comprehensive clone screening and evaluation of fed-batch strategies in a microbioreactor and lab scale stirred tank bioreactor system: Application on *Pichia pastoris* producing *Rhizopus oryzae* lipase. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2014.
- HONG, Q. et al. Screening of adjunct cultures and their application in ester formation in Camembert-type cheese. **Food Microbiology**, v. 70, p. 33–41, 2018.
- HOTTA, Y. et al. Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hyperthermophilic archaeon. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3925–3931, 2002.
- HOWARD, G. T. Microbial biodegradation of polyurethane. **Recent Developments in Polymer Recycling**, v. 661, n. 2, p. 215–238, 2011.
- HUANG, J.; ZHANG, Y.; HU, Y. Functional Characterization of a Marine *Bacillus* Esterase and its Utilization in the Stereo-Selective Production of D-Methyl Lactate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1467–1481, 2016.
- IMURA, T. et al. Production of Sophorolipids from Non-edible *Jatropha* Oil by *Stamerella bombicola* NBRC 10243 and Evaluation of their Interfacial Properties. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 10, p. 857–864, 2013.
- INMACULADA, N. G.; ÁLVARO, S. F.; FRANCISCO, G. C. Overexpression, purification, and biochemical characterization of the esterase Est0796 from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Molecular Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 651–660, 2013.
- JAWED, K. et al. Engineered Production of Short Chain Fatty Acid in *Escherichia coli* Using Fatty Acid Synthesis Pathway. **PloS One**, p. 1–20, 2016.
- JAYANATH, G. et al. A novel solvent tolerant esterase of GDSGG motif subfamily from solar saltern through metagenomic approach: Recombinant expression and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 393–401, 2018.
- JENSEN, M. V et al. Characterisation of a New Family of Carboxyl Esterases with an OsmC Domain. **Plus One**, v.16, n.10, p. 1–22, 2016.
- JESUS, S. S. DE; NETO, J. M.; FILHO, R. M. Hydrodynamics and mass transfer in bubble column , conventional airlift , stirred airlift and stirred tank bioreactors , using viscous fluid : A comparative study. **Biochemical Engineering Journal**, v. 118, p. 70–81, 2017.
- KADRI, T. et al. Production and characterization of novel hydrocarbon degrading enzymes from *Alcanivorax borkumensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 230–240, 2018.
- KAISER, P. et al. A novel esterase from *Bacillus subtilis* ( RRL 1789 ): Purification and characterization of the enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 45, n. 2, p. 262–268, 2006.
- KAMBIRANDA, D. M. et al. Expression of esterase gene in yeast for organophosphates biodegradation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, n. 1, p. 15–20, maio 2009.

- KANG, C. et al. A novel family VII esterase with industrial potential from compost metagenomic library. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 41, 2011.
- KANG, S.-H. et al. Optimization of induction conditions for Bacillus-derived esterase production by high-cell density fermentation of recombinant Escherichia coli. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 149–154, 2017.
- KOURIST, R.; BRUNDIEK, H.; BORNSCHEUER, U. T. Protein engineering and discovery of lipases. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 1, p. 64–74, jan. 2010.
- KOWALCZYK, S. et al. A co-utilization strategy to consume glycerol and monosaccharides by Rhizopus strains for fumaric acid production. **AMB Express**, v. 8, n. 1, 2018.
- KUDANGA, T. et al. Esterases and putative lipases from tropical isolates of Aureobasidium pullulans. **Journal of basic microbiology**, v. 47, n. 2, p. 138–47, abr. 2007.
- KUMAR, S. et al. Thermozyms: Adaptive strategies and tools for their biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 278, n. November 2018, p. 372–382, 2019.
- LAI, O.-M. et al. **Lipase/Esterase: Properties and Industrial Applications**. Elsevier, 2018.
- LEATHERS, T. D. et al. Lipase production by diverse phylogenetic clades of Aureobasidium pullulans. **Biotechnology letters**, v. 35, n. 10, p. 1701–6, out. 2013.
- LEE, Y. S. Isolation and characterization of a novel cold-adapted esterase, MtEst45, from Microbulbifer thermotolerans DAU221. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAR, 2016.
- LEHMANN, S. C. et al. Characterization of a Novel Pseudomonas stutzeri Lipase / Esterase with Potential Application in the Production of Chiral Secondary Alcohols. **Advances in Bioscience and Biothechnology**, v. 13, n. November, p. 1009–1017, 2014.
- LI, P. Y. et al. Structural and mechanistic insights into the improvement of the halotolerance of a marine microbial esterase by increasing intra- and interdomain hydrophobic interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 18, p. 1–12, 2017.
- LI, W. et al. Characterization of two novel thermostable esterases from Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum. **Protein expression and purification**, v. 152, n. April, p. 64–70, 2018.
- LIU, C.-H. et al. Optimizing lipase production from isolated Burkholderia sp. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, n. 4, p. 511–516, jul. 2012.
- LIU, Z. et al. Cloning, characterization and expression of the extracellular lipase gene from Aureobasidium pullulans HN2-3 isolated from sea saltern. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 2, p. 245–55, ago. 2008.
- LÓPEZ-LÓPEZ, O.; CERDÁN, M. E.; SISO, M. I. G. New Extremophilic Lipases and Esterases from Metagenomics. **Current Protein & Peptide Science**, v. 15, n. 5, p. 445–455, 2014.
- LUO, Z.-H. et al. Purification and characterization of an intracellular esterase from a marine Fusarium fungal species showing phthalate diesterase activity. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 97, p. 7–12, jan. 2015a.

- LUO, Z.-H. et al. Purification and characterization of an intracellular esterase from a marine *Fusarium* fungal species showing phthalate diesterase activity. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 97, p. 7–12, 1 jan. 2015b.
- MAESTER, T. C. et al. Characterization of EST3: a metagenome-derived esterase with suitable properties for biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5815–5827, 26 jul. 2016.
- MAGDOULI, S. et al. Bioresource Technology Valorization of raw glycerol and crustacean waste into value added products by *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 57–68, 2017a.
- MAGDOULI, S. et al. Valorization of raw glycerol and crustacean waste into value added products by *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 57–68, 2017b.
- MAGNIN, A. et al. Enzymatic recycling of thermoplastic polyurethanes: Synergistic effect of an esterase and an amidase and recovery of building blocks. **Waste Management**, v. 85, p. 141–150, 15 fev. 2019.
- MAIA, D. L. H.; FERNANDES, F. A. N. Effects of Operating Conditions on the Copolymerization of Castor Oil Maleate–Styrene by Suspension Polymerization. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 13, n. 5, p. 1900017, 16 out. 2019.
- MALDONADO, R. R. et al. Application of Yeast Hydrolysate in Extracellular Lipase Production by *Geotrichum candidum* in Shaken Flasks, Stirred Tank, and Airlift Reactors. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 93, n. 9, p. 1524–1530, 2015.
- MANITCHOTPISIT, P. et al. *Aureobasidium pullulans* as a source of liamocins (heavy oils) with anticancer activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 8, p. 2199–2204, 2014.
- MATOS, J. et al. Agricultural Feedstock Supplemented with Manganese for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 0, n. 0, p. 0, 2017.
- MATSUMIYA, Y. et al. Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp. **Journal of applied microbiology**, v. 108, n. 6, p. 1946–53, jun. 2010.
- MAZLAN, S. N. H. S. et al. Crystallization and structure elucidation of GDSL esterase of *Photobacterium* sp. J15. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1188–1194, 2018.
- MAZZUCOTELLI, C. A.; MOREIRA, M. D. R.; ANSORENA, M. R. Statistical optimization of medium components and physicochemical parameters to simultaneously enhance bacterial growth and esterase production by *Stenotrophomonas* sp. **Canadian journal of microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1–11, 2015.
- MAZZUCOTELLI, C. A.; MOREIRA, R.; ANSORENA, R. Statistical optimization of medium components and physicochemical parameters to simultaneously enhance bacterial growth and esterase production by *Bacillus thuringiensis*. **Canadian journal of microbiology**, v. 62, n. 7, p. 24–34, 2016.
- MENESES, D. P. et al. The yeast-like fungus *Aureobasidium thailandense* LB01 produces a

new biosurfactant using olive oil mill wastewater as an inducer. **Microbiological Research**, v. 204, n. April, p. 40–47, 2017.

MERÍN, M. G.; MORATA DE AMBROSINI, V. I. Kinetic and metabolic behaviour of the pectinolytic strain *Aureobasidium pullulans* GM-R-22 during pre-fermentative cold maceration and its effect on red wine quality. **International Journal of Food Microbiology**, v. 285, n. February, p. 18–26, 2018.

MICHELIN, M. et al. Production of Biomass-Degrading Enzymes by *Trichoderma reesei* Using Liquid Hot Water-Pretreated Corn cob in Different Conditions of Oxygen Transfer. **BioEnergy Research**, v. 12, n. 7, p. 583–592, 2019.

MIETTINEN, H. et al. Screening of microbes for lipases specific for saturated medium and long-chain fatty acids of milk fat. **International Dairy Journal**, v. 32, n. 2, p. 61–67, out. 2013.

MONTI, D. et al. Purification and characterization of the enantioselective esterase from *Kluyveromyces marxianus* CBS 1553. **Journal of Biotechnology**, v. 133, n. 1, p. 65–72, 2008.

MORAIS, R. K. S.; ABUD, A. K. S. Utilização de biossurfactantes produzidos a partir de resíduos agroindustriais na biorremediação do petróleo. **Science Plena**, v. 8, n. 10, p. 1–7, 2012.

MORAIS, W. G. et al. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification**, v. 123, p. 26–34, 2016.

MOUAFO, T. H.; MBAWALA, A.; NDJOUENKEU, R. Effect of Different Carbon Sources on Biosurfactants' Production by Three Strains of *Lactobacillus* spp. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 5034783, 2018.

NASR, S. et al. *Aureobasidium mangrovei* sp. nov., an ascomycetous species recovered from Hara protected forests in the Persian Gulf, Iran. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 9, p. 1697–1705, 6 set. 2018.

OLEAS, G. et al. Heterologous expression, purification and characterization of three novel esterases secreted by the lignocellulolytic fungus *Penicillium purpurogenum* when grown on sugar beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 443–444, p. 42–48, 2017.

OZCAN, B. et al. Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 105–110, 2 jan. 2009.

PANDA, T.; GOWRISHANKAR, B. S. Production and applications of esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 2, p. 160–9, abr. 2005.

PAPAGORA, C.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 413–420, out. 2013.

PARK, J. K. et al. Isolation of esterase producing *Lactobacillus brevis* nj13 from kimchi and investigation of effective medium ingredients for esterase production using statistical method.

**The Journal of animal and plant and sciences**, v. 23, n. 1, p. 149–156, 2013.

PINO, M. S. et al. Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. **Chemical Engineering Journal**, v. 347, n. April, p. 119–136, 2018.

PRADEEP, S. et al. International Biodeterioration & Biodegradation Achromobacter denitri fi cans strain SP1 produces an intracellular esterase upon utilizing di ( 2ethylhexyl ) phthalate. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 160–167, 2015.

PRIJI, P. et al. Production, optimization, and partial purification of lipase from Pseudomonas sp. strain BUP6, a novel rumen bacterium characterized from Malabari goat. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 71–78, 2015.

QIAO, C. L. et al. Culture and characteristics of recombinant protein production of an Escherichia coli strain expressing carboxylesterase B1. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 58, n. 2, p. 77–81, 2006.

RAHIMI, M. J. et al. Computational fluid dynamics study of full-scale aerobic bioreactors: Evaluation of gas–liquid mass transfer, oxygen uptake, and dynamic oxygen distribution. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 139, p. 283–295, 1 nov. 2018.

RAHMAN, M. A. et al. Characterization of a novel cold active and salt tolerant esterase from Zunongwangia profunda. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 85, p. 1–11, 2016.

RANJAN, R. et al. Discovery of a diverse set of esterases from hot spring microbial mat and sea sediment metagenomes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 572–581, 2018.

REN, X. et al. Optimization of recombinant hyperthermophilic esterase production from agricultural waste using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 18, p. 2345–2349, 2006.

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, 2017.

SAIKA, A. et al. Deficiency of biodegradable plastic-degrading enzyme production in a gene-deletion mutant of phyllosphere yeast, Pseudozyma antarctica defective in mannosylerythritol lipid biosynthesis. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 100, 6 dez. 2019.

SALMON, D. N. X. et al. Bioprocess for phytase production by Ganoderma sp. MR-56 in different types of bioreactors through submerged cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 288–297, 15 out. 2016.

SAMESHIMA-YAMASHITA, Y. et al. Pretreatment with an esterase from the yeast Pseudozyma antarctica accelerates biodegradation of plastic mulch film in soil under laboratory conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. xx, n. xx, p. 6–11, 2018.

SANDOVAL, G. **Lipases and Phospholipases - Methods and Protocols**. London, Springer, 2009.

SÄRKELÄ, R. et al. Mixing efficiency studies in an airlift bioreactor with helical flow promoters for improved reactor performance. **Chemical Engineering and Processing -**

**Process Intensification**, v. 137, p. 80–86, 1 mar. 2019.

SARUP, R. et al. Pullulan : A novel molecule for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 171, p. 102–121, 2017.

SATO, S. et al. Degradation profiles of biodegradable plastic films by biodegradable plastic-degrading enzymes from the yeast *Pseudozyma antarctica* and the fungus *Paraphoma* sp. B47-9. **Polymer Degradation and Stability**, v. 141, p. 26–32, 1 jul. 2017.

SHAKIBA, M. H. et al. Cloning, expression and characterization of a novel cold-adapted GDSL family esterase from *Photobacterium* sp. strain J15. **Extremophiles**, v. 20, n. 1, p. 45–55, 16 jan. 2016.

SINGH, R. et al. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 6, p. 679–682, 2006.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–15, 2016.

SOUZA, K. S. T. et al. Lipid production by yeasts grown on crude glycerol from biodiesel industry. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 4, p. 357–363, 21 abr. 2017.

SOUZA, L. C. et al. Microbiological strategies for sustainable production of bioactive compounds using oil produced water effluent with sucrose and crude glycerine as carbon sources. **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 451–456, 2018.

STEENKAMP, L.; BRADY, D. Optimisation of stabilised Carboxylesterase NP for enantioselective hydrolysis of naproxen methyl ester. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 1419–1426, dez. 2008.

SUMBY, K. M.; GRBIN, P. R.; JIRANEK, V. Characterization of EstCOo8 and EstC34, intracellular esterases, from the wine-associated lactic acid bacteria *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 2, p. 413–422, 1 fev. 2013.

SURYIA PRABHA, M. et al. Statistical analysis of production of protease and esterase by a newly isolated *Lysinibacillus fusiformis* AU01: purification and application of protease in sub-culturing cell lines. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 33–46, 2015.

TAKAÇ, S.; ÜNLÜ, A. E.; ERDEM, B. Oxygen transfer strategy modulates the productions of lipase and esterase enzymes by *Candida rugosa*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, n. 3–4, p. 150–154, 2010.

TEC-CAAMAL, E. N. et al. Production of an oil-degrading bacterial consortium in an airlift bioreactor: Insights into the mass transfer of the oil and oxygen. **Chemical Engineering Science**, v. 192, p. 507–515, 31 dez. 2018.

TOKIWA, Y. et al. Biodegradability of plastics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 9, p. 3722–3742, 2009.

TORRES, S. et al. Production and Purification of a Solvent-Resistant Esterase from *Bacillus licheniformis* S-86. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 7, p. 221–232, 2008.

- VALENZUELA, S. V et al. Biochimie Unusual carboxylesterase bearing a GGG ( A ) X-type oxyanion hole discovered in *Paenibacillus barcinonensis* BP-23. **Biochimie**, v. 104, n. 9, p. 108–116, 2014.
- VAQUERO, M. E. et al. Expression and properties of three novel fungal lipases / sterol esterases predicted in silico : comparison with other enzymes of the *Candida rugosa* -like family. **Applied Microbiology**, v. 99, n. 8, p. 10057–10067, 2015.
- VAQUERO, M. E. et al. Properties , structure , and applications of microbial sterol esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 2047–2061, 2016.
- VARGAS-SUÁREZ, M.; FERNÁNDEZ-CRUZ, V.; LOZA-TAVERA, H. Biodegradation of polyacrylic and polyester polyurethane coatings by enriched microbial communities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 7, p. 3225–3236, 2019.
- VICTORIA GAUTÉRIO, G. et al. Production of xylanolytic enzymes and xylooligosaccharides by *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 in submerged cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 125, n. August, p. 335–345, 2018.
- WANG, G. et al. A novel cold-adapted and highly salt-tolerant esterase from *Alkalibacterium* sp. SL3 from the sediment of a soda lake. **Scientific Reports**, v. 6, n. October 2015, p. 1–10, 2016.
- WANG, Y. et al. Utilization of deep-sea microbial esterase PHE21 to generate chiral sec-butyl acetate through kinetic resolutions. **Chirality**, v. 30, n. 8, p. 1027–1035, 2018.
- WICKA, M. et al. Cloning, expression, and biochemical characterization of a cold-active GDSL-esterase of a *Pseudomonas* sp. S9 isolated from Spitsbergen island soil. **Acta Biochimica Polonica**, v. 63, n. 1, p. 117–125, 2016.
- WU, G. et al. A novel esterase from a psychrotrophic bacterium *Psychrobacter celer* 3Pb1 showed cold-adaptation and salt-tolerance. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 119–126, dez. 2013.
- XU, F. et al. Discovery and expression of a *Pseudomonas* sp. esterase as a novel biocatalyst for the efficient biosynthesis of a chiral intermediate of pregabalin. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 20, n. 3, p. 473–487, 2015.
- XUE, Y. et al. Cloning, expression and characterization of a novel esterase from *Bacillus pumilus*. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 879–885, 13 set. 2012.
- YAN, J. et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* to Simultaneously Produce Lipase and Single Cell Protein from Agro-industrial Wastes for Feed. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.
- YANG, Y. et al. **Renewable sourced biodegradable mulches and their environment impact***Scientia Horticulturae*. Elsevier B.V, 2020.
- YEN, H.-W.; LIU, Y. X. Application of airlift bioreactor for the cultivation of aerobic oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with different aeration rates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 2, p. 195–198, 1 ago. 2014.
- ZARAFETA, D. et al. EstDZ3: A new esterolytic enzyme exhibiting remarkable thermostability. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, p. 1–14, 2016.

ZHANG, S. et al. Improved thermostability of esterase from *Aspergillus fumigatus* by site-directed mutagenesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 64–65, p. 11–16, out. 2014.

ZHANG, T. et al. Advances in characteristics analysis, measurement methods and modelling of flow dynamics in airlift reactors. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 144, p. 107633, 1 out. 2019.

ZHENG, J. et al. Protein Expression and Purification A stereoselective esterase from *Bacillus megaterium* : Purification , gene cloning , expression and catalytic properties. **Protein Expression and Purification**, v. 136, p. 66–72, 2017.



**ANEXO A – PRECIPITAÇÃO DE ESTERASE PRODUZIDA POR *A. pullulans* URM 7059 EM SHAKER**

Tabela 1 – Precipitação de esterase precipitada por diferentes protocolos a 4 °C

Protocolos	Proteína Total (mg)	Atividade Total (U)		Atividade específica (U/mg)		Rendimento (%)		Fator de purificação	
		<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -NPC	<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -NPC	<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -NPC	<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -NPC
<b>Caldo fermentado</b>	16,35 ± 0,68	3072,65 ± 194,65	4047,79 ± 358,49	190,10 ± 17,84	250,35 ± 26,75	100,00	100,00	1,00	1,00
<b>PEG 1500</b>	1,46 ± 0,02	65,17 ± 8,72	70,48 ± 9,17	44,20 ± 6,60	47,66 ± 5,28	2,12 ± 0,27	1,74 ± 0,22	0,23 ± 0,04	0,19 ± 0,01
<b>PEG 4000</b>	2,70 ± 0,11	69,83 ± 10,24	97,35 ± 9,92	25,47 ± 4,13	35,57 ± 4,98	2,29 ± 0,49	2,40 ± 0,22	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,01
<b>PEG 6000</b>	2,04 ± 0,12	62,43 ± 11,01	89,14 ± 13,18	30,46 ± 3,58	43,98 ± 8,74	2,02 ± 0,29	2,23 ± 0,52	0,16 ± 0,00	0,18 ± 0,05
<b>Fração 30 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,01 ± 0,0	3,9 ± 0,42	5,47 ± 0,33	387,93 ± 78,48	542,04 ± 89,42	0,12 ± 0,0	0,13 ± 0,0	2,03 ± 0,29	2,15 ± 0,14
<b>Fração 30-90 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	2,46 ± 0,04	546,15 ± 16,10	1121,25 ± 44,89	222,50 ± 6,66	457,05 ± 26,41	17,84 ± 1,70	27,88 ± 3,21	1,17 ± 0,14	1,84 ± 0,24

Fonte: Elaborada pela autora.

## ANEXO B – PRODUÇÃO DAS ESTERASES PRODUZIDAS POR *A. pullulans* URM 7059 EM BIORREATORES

Tabela 1 – Atividade de esterase produzida por *Aureobasidium pullulans* URM 7059 em shaker e biorreator tanque agitado

Tempo (h)	Shaker		
	Atividade enzimática <i>p</i> -NPC (U/mL)	Atividade enzimática <i>p</i> -NPB (U/mL)	Glicerol (g/L)
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,501 ± 0,10
6	2,80 ± 0,6	0,5 ± 0,5	1,467 ± 0,29
24	8,80 ± 1,4	13,3 ± 0,7	0,510 ± 0,06
30	14,1 ± 1,0	14,1 ± 0,95	0,105 ± 0,0
48	25,1 ± 2,34	19,3 ± 1,4	0,099 ± 0,0
Biorreator Tanque Agitado			
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,135 ± 0,07
6	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,4	1,024 ± 0,014
24	10,1 ± 0,3	11,4 ± 0,6	0,168 ± 0,018
30	18,9 ± 0,2	16,2 ± 0,7	0,076 ± 0,0
48	18,3 ± 0,9	27,0 ± 1,3	0,076 ± 0,0

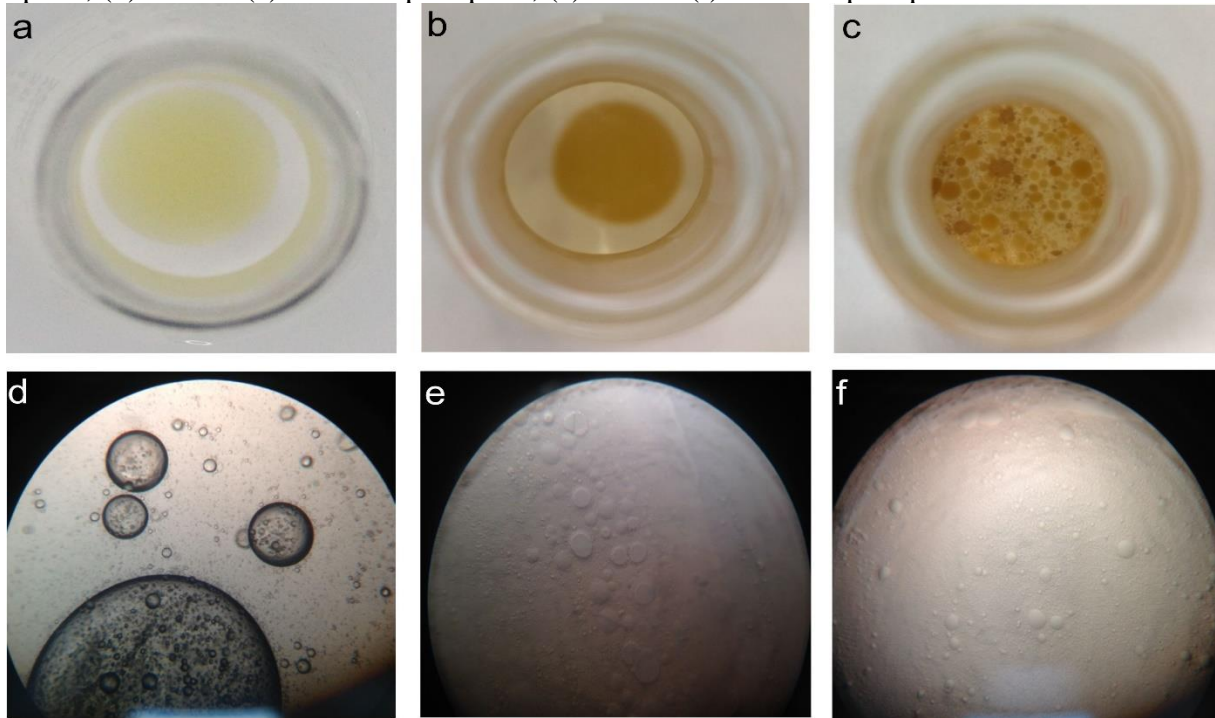
Fonte: Elaborada pela autora.

Table 2 – Resultados de atividade enzimática (U/mL) e consumo de glicerol (g/L) na produção de esterases por *Aureobasidium pullulans* URM 7059 com diferentes taxas de aeração (L/min) em biorreator *Airlift*

2 L/min					
Tempo (h)	0	6	24	30	48
<i>p</i> -NPB (U/mL)	0,0 ± 0,0	1,80 ± 0,3	9,70 ± 1,3	15,2 ± 0,2	4,80 ± 0,8
<i>p</i> -NPBC(U/mL)	0,0 ± 0,0	3,50 ± 0,80	19,8 ± 1,96	21,2 ± 2,8	16,1 ± 1,4
Glicerol (g/L)	1,296 ± 0,10	0,787 ± 0,09	0,076 ± 0,0	0,076 ± 0,0	0,076 ± 0,0
4 L/min					
Tempo (h)	0	6	24	30	48
<i>p</i> -NPB (U/mL)	0,0 ± 0,0	3,10 ± 0,84	21,9 ± 1,38	9,20 ± 0,84	4,1 ± 0,04
<i>p</i> -NPBC(U/mL)	0,0 ± 0,0	7,30 ± 1,22	18,8 ± 2,24	19,0 ± 2,0	23,0 ± 2,1
Glicerol (g/L)	1,328±0,025	0,997 ± 0,05	0,086 ± 0,0	0,076 ± 0,0	0,076 ± 0,0
6 L/min					
Tempo (h)	0	6	24	30	48
<i>p</i> -NPB (U/mL)	0,0 ± 0,0	3,9 ± 0,70	6,7 ± 0,6	7,7 ± 1,1	9,1 ± 0,4
<i>p</i> -NPBC(U/mL)	0,0 ± 0,0	2,10 ± 0,43	21,7 ± 2,5	26,8 ± 3,4	24,1 ± 1,5
Glicerol (g/L)	1,408 ± 0,08	1,296 ± 0,09	0,076 ± 0,0	0,076 ± 0,0	0,076 ± 0,0
8 L/min					
Tempo (h)	0	6	24	30	48
<i>p</i> -NPB (U/mL)	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,1	28,6 ± 1,8	20,2 ± 1,3	9,5 ± 1,4
<i>p</i> -NPBC(U/mL)	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,2	26,6 ± 1,5	13,4 ± 0,3	4,4 ± 0,3
Glicerol (g/L)	1,309±0,025	0,945 ± 0,0	0,076 ± 0,0	0,076 ± 0,0	0,076 ± 0,0

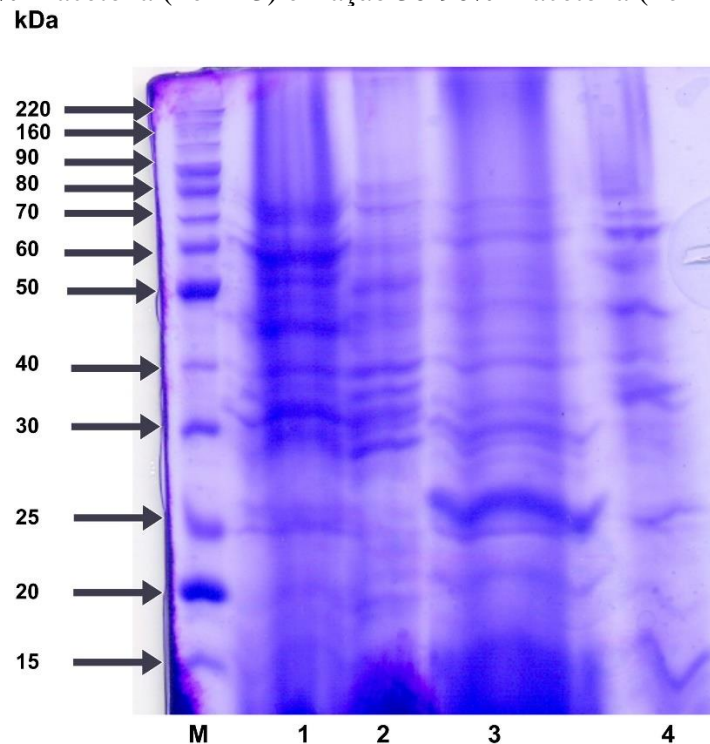
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3 – Aplicação das esterases sobre o polímero (MACO-St): (a) controle e (d) microscopia optica; (b) Est-1 e (e) microscopia optica; (c) Est-2 e (f) microscopia optica



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 1 – SDS-PAGE gel que ilustra o perfil das proteínas precipitadas por diferentes protocolos. Marcador de peso molecular de proteínas (Perfil M); Proteínas do caldo fermentado concentrado em Membrana de ultrafiltração 10 kDa (Perfil 1); Proteínas precipitadas por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  : fração 30% (Perfil 2), fração 30 % + acetona (Perfil 3) e fração 30-90% + acetona (Perfil 4)



Fonte: Elaborada pela autora.