Purificação da lipase de *Geotrichum candidum* produzida por cultivo submerso.

Mairlis S. Sá[1], Leonardo A. Miguel[2], Michelle C. Murakami[3], Daniela B. Hirata[4]

[1]1Curso de Biotecnologia da UNIFAL-MG, Alfenas MG, Brasil

(mairlis.sa@sou.unifal-mg.edu.br)

[2]Pós-Graduação em Ciências Ambientais da UNIFAL-MG, Alfenas MG, Brasil

[3]Curso de Biotecnologia da UNIFAL-MG, Alfenas MG, Brasil

[4]Instituto de Química da UNIFAL-MG, Alfenas MG, Brasil

Resumo: No presente trabalho, a lipase de *Geotrichum candidum* foi produzida por cultivo submerso e submetido à purificação por precipitação com acetona a 10ºC em duas etapas consecutivas. A eficiência do processo foi avaliada quanto à recuperação da atividade enzimática, ao fator de purificação e à remoção de proteínas contaminantes, visando à obtenção de uma preparação enzimática adequada para etapas posteriores de imobilização.

Palavras-chave: *Geotrichum;* lipase; Purificação; fermentação.

INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas com função catalítica, capazes de acelerar reações químicas com alta especificidade, sendo essenciais em diversos processos biológicos e industriais (Guajardo & Schrebler, 2024). As lipases encontram-se no grupo das hidrolases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3), sendo vastamente utilizadas devido à sua elevada versatilidade e especificidade. Possuem como função catalisar a hidrólise de ligações éster de triglicerídeos, liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Chandra et al., 2020).

Para que o uso de lipases se torne economicamente viável em escala industrial, a técnica de imobilização enzimática desponta como uma estratégia consolidada. Esse processo consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido, viabiliza sua recuperação e reutilização em múltiplos ciclos reacionais, além de ampliar a estabilidade térmica e operacional do biocatalisador (Rodrigues et al., 2019). Nas lipases, especificamente, a imobilização sobre suportes hidrofóbicos pode desencadear o fenômeno de ativação interfacial. Esse mecanismo decorre da estrutura peculiar dessas enzimas, cujo sítio ativo encontra-se protegido por uma estrutura helicoidal anfifílica conhecida como "tampa" (ou *lid*). A interação com interfaces hidrofóbicas induz uma mudança conformacional nessa estrutura, que se desloca para expor o centro catalítico e estabilizar a enzima em sua forma aberta e cataliticamente ativa (Cong et al., 2026).

Diferentes estratégias de imobilização têm sido investigadas, e a seleção do suporte e do método apropriados determina a eficiência do derivado a ser aplicado em uma reação de interesse industrial (Ferreira et al., 2018).

As lipases ocorrem naturalmente em diferentes organismos, abrangendo fontes animais, vegetais e microbianas. Entre essas fontes, os microrganismos respondem pela maior parcela da produção industrial de lipases, predominância que se justifica pela expressiva diversidade bioquímica microbiana, pela facilidade de manipulação genética e pela viabilidade de cultivo em larga escala por meio de processos fermentativos (Chandra et al., 2020). Dentro do grupo microbiano, bactérias, leveduras e fungos filamentosos são reconhecidos como produtores eficientes dessas enzimas (Chandra et al., 2020).

Os fungos filamentosos despertam interesse biotecnológico em virtude de sua capacidade de secretar lipases no meio extracelular, o que simplifica as etapas subsequentes de recuperação e purificação. Gêneros como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma* figuram entre os mais investigados e explorados industrialmente para a produção de lipases com propriedades catalíticas diversas (Mendes et al., 2024). Nesse contexto, destaca-se o fungo *Geotrichum candidum*, que reúne características de relevância industrial ao produzir uma lipase extracelular cuja atividade hidrolítica concentra-se em ácidos graxos contendo insaturações do tipo cis-9 ou cis,cis-9,12, independentemente de sua posição na molécula de triglicerídeo (Karamanou et al., 2023).

A produção de enzimas microbianas pode ser conduzida por diferentes vias fermentativas, com destaque para o cultivo submerso e o cultivo em estado sólido. Cada uma apresenta vantagens e limitações que determinam sua aplicabilidade. O cultivo em estado sólido caracteriza-se pelo crescimento do microrganismo sobre um substrato sólido na ausência de água livre. Essa via é vantajosa para fungos filamentosos, pois simula seu habitat

natural. Em contrapartida, apresenta dificuldades no controle de parâmetros como pH, temperatura e aeração, além da limitação na homogeneização do meio. O cultivo em estado sólido, por sua vez, ocorre em meio líquido contendo nutrientes solúveis e constitui o método predominante na indústria de enzimas. Sua principal vantagem reside no controle preciso e homogêneo das condições de cultivo, o que viabiliza a otimização e a padronização do processo (Singhania et al., 2010; López-Gómez e Venus, 2021).

Para o cultivo de *Geotrichum candidum* e a produção de sua lipase, o cultivo submerso demonstra ser a estratégia mais apropriada, uma vez que a fisiologia do próprio fungo favorece a secreção extracelular da enzima. No cultivo submerso, a lipase é liberada diretamente no meio líquido, podendo ser recuperada por operações simples, como filtração ou centrifugação. Essa característica simplifica as etapas iniciais de recuperação e purificação quando comparada ao cultivo em estado sólido que exigiria etapas adicionais de extração para recuperar a enzima do substrato sólido. Além disso, a produção eficiente de lipase por *Geotrichum candidum* é induzida pela presença de fontes lipídicas, como óleos vegetais. No ambiente líquido e sob agitação constante no processo do cultivo submerso, esses óleos formam uma emulsão que cria uma extensa área de contato na interface óleo-água, sinalizando ao fungo a produção e secreção enzimática com eficiência superior à distribuição heterogênea observada em substratos sólidos (Ramos et al., 2015; Morais et al., 2016).

Soma-se a isso o potencial biotecnológico de *Geotrichum candidum*, cuja produção enzimática por cultivo submerso pode ser otimizada com o emprego de substratos de baixo custo, como o melaço de soja. Esse resíduo gerado em larga escala durante a produção de proteína concentrada de soja, reúne em sua composição carboidratos solúveis, proteínas residuais, peptídeos, aminoácidos livres e minerais como fósforo, potássio e cálcio. A presença simultânea de fontes de carbono e nitrogênio em uma única matriz reduz a dependência de componentes comerciais, como peptona e glicose, diminui o custo do meio fermentativo e viabiliza a produção de lipase ativa em níveis comparáveis aos obtidos com meios sintéticos, comprovando o potencial de reaproveitamento desse subproduto agroindustrial (Morais et al., 2016)

Ao término do cultivo submerso, a lipase de interesse encontra-se no caldo de que reúne restos celulares, componentes residuais do meio de cultura, além de outras proteínas e metabólitos (Guajardo & Schrebler, 2024). Sendo assim, a purificação enzimática representa uma etapa crítica e indispensável. Sua execução viabiliza a caracterização bioquímica da enzima na ausência de interferentes, maximiza a eficiência da imobilização, evitando que contaminantes compitam pelos sítios de ligação no suporte sólido, e assegura a pureza do produto final, prevenindo reações secundárias indesejadas, requisito essencial para aplicações de alto valor agregado, como nas indústrias farmacêutica e alimentícia (Sharma et al., 2022).

A cromatografia representa uma das técnicas mais consolidadas para a purificação de lipases, proporcionando elevada pureza e resolução na separação de proteínas. Métodos como troca iônica, exclusão molecular e afinidade são amplamente descritos na literatura para a obtenção de preparações enzimáticas com alta atividade específica (Saxena et al., 2003). No entanto, o alto custo dos equipamentos, a dificuldade de escalonamento para produção industrial e os baixos rendimentos obtidos em algumas etapas limitam o emprego dessas técnicas em processos de larga escala. Diante dessas limitações, a precipitação com solventes orgânicos surge como uma alternativa de baixo custo, fácil execução e maior viabilidade para aplicações industriais.

A precipitação com solventes orgânicos adiciona compostos como acetona ou etanol ao extrato enzimático bruto, reduz a constante dielétrica do meio e promove a agregação e precipitação das proteínas proteínas. Kamanski (2017) utilizou esta estratégia para purificar lipase de *Aspergillus niger*, combinou a mudança de força iônica do meio com NaCl e adicionou acetona ou etanol sob diferentes concentrações e vazões. A autora demonstrou que a precipitação com solventes orgânicos produz preparações enzimáticas com atividade específica aumentada, sendo uma alternativa de baixo custo e fácil escalonamento frente às técnicas cromatográficas. Kamanski (2017) destacou que as lipases microbianas apresentam potencial de aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêutica e na produção de biocombustíveis, além do tratamento de águas residuais com óleo. A autora apontou o alto custo das lipases comerciais como fator limitante para o uso dessas enzimas, tornando a otimização de métodos de purificação de baixo custo uma área de interesse.

O sucesso da precipitação com solventes orgânicos depende da concentração do solvente, da temperatura de adição e da taxa de alimentação ao extrato bruto. Kamanski (2017) verificou que solventes refrigerados minimizam danos estruturais às enzimas e preservam sua atividade catalítica. A autora observou que as lipases toleram solventes orgânicos melhor que outras hidrolases. Kamanski (2017) destacou que a combinação da precipitação com solventes e da alteração da força iônica do meio remove interferentes e produz preparações enzimáticas concentradas para aplicações

biotecnológicas. A autora concluiu que a precipitação com solventes orgânicos é uma técnica promissora e de baixo custo para purificar lipases microbianas, viabilizando sua aplicação em processos como a hidrólise de óleos residuais de fritura e contribuindo para a minimização de impactos ambientais.

Entre as estratégias utilizadas para a purificação da lipase de *Geotrichum candidum*, destacam-se a precipitação com solventes orgânicos e as técnicas cromatográficas, que conduzem à obtenção de preparações enzimáticas concentradas e com atividade específica compatível com as aplicações pretendidas (Ferreira et al., 2018).

Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo a purificação da lipase de *Geotrichum candidum* produzida por cultivo submerso, utilizando a precipitação com acetona como método de concentração e purificação da enzima.

MATERIAS E MÉTODOS

A cepa de *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 foi utilizada e mantida em ágar Sabouraud dextrose, sob condições controladas, conforme metodologia estabelecida por Castro et al. (2016). Para o preparo do inóculo, uma colônia com diâmetro aproximado de 5 mm foi assepticamente transferida para um frasco Erlenmeyer com capacidade de 1000 mL, contendo 100 mL de meio de inoculação previamente esterilizado.

O meio de inoculação, era composto por peptona de caseína a 2% (m/v), extrato de levedura a 0,1% (m/v), $MgSO_4$ a 0,05% (m/v), $NaNO_3$ a 0,05% (m/v) e óleo de algodão a 1% (v/v) como indutor. Após a inoculação, o erlenmeyer foi mantido em incubadora shaker de piso, a 30 °C e 250 rpm, por um período de 24 horas (Castro et al., 2016). Após esse período, foi retirada uma alíquota de 10 mL do inóculo, a qual foi assepticamente transferida para um frasco Erlenmeyer com capacidade de 1000 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo previamente autoclavado, composto por peptona de caseína a 3% (m/v), $NaNO_3$ a 0,1% (m/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 0,1% (m/v) e óleo de algodão adicionado separadamente a 1,5% (v/v). O cultivo permaneceu por 48 horas sob as mesmas condições de temperatura (30 °C) e agitação (250 rpm) (Ferreira et al., 2018). Após esse período, o caldo fermentado foi filtrado a vácuo em papel de filtro, e o sobrenadante obtido foi submetido à liofilização e utilizando como extrato enzimático bruto (Souza et al., 2018).

A purificação da lipase de *Geotrichum candidum* produzida por cultivo submerso foi realizada por precipitação com acetona a 10 °C, em procedimento adaptado de protocolos descritos para lipases fúngicas (Ferreira et al., 2018; Scopes, 1994).

O volume total, atividade hidrolítica e concentração de proteínas totais foram determinados antes e após o procedimento de purificação. A atividade hidrolítica foi determinada pelo método de emulsão de azeite de oliva (Nisha, Karthikeyan & Ramadoss, 2012), enquanto a concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (1976)..

Para a purificação, adicionou-se acetona previamente resfriada a 10 ºC na proporção de 2:1 (acetona:caldo bruto), seguida de homogeneização em vórtex por 3 minutos e centrifugação a 10 ºC e 5000 rpm por 20 minutos (Ferreira et al., 2018). O precipitado obtido foi ressuspendido em 10 mL de tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0. O sobrenadante remanescente foi submetido a nova precipitação com acetona a 10 °C, na proporção de 2:1 (acetona:sobrenadante), repetindo-se as etapas de homogeneização e centrifugação nas mesmas condições descritas acima. Ao final, foram calculados atividade específica (AE), fator de purificação (FP), recuperação da atividade (AR) e proteína recuperada (PR).

A recuperação da atividade (AR) foi calculada conforme a Eq. (1):

$$AR(\%) = \frac{AT_f}{AT_i} \times 100 \quad (1)$$

onde AT_f é a atividade total final (U) obtida após a precipitação e AT_i é a atividade total inicial (U) presente no extrato bruto antes da purificação.

A proteína recuperada (PR) foi calculada conforme a Eq. (2):

$$PR(\%) = \frac{PT_f}{PT_i} \times 100 \quad (2)$$

Onde PT_f é a quantidade final de proteína total (mg) presente no precipitado e PT_i é a quantidade inicial de proteína total (mg) no extrato bruto antes da purificação.

A atividade específica (AE) foi calculada dividindo-se a atividade hidrolítica pela concentração de proteína, conforme a Eq. (3):

$$AE\,(\mathrm{U/mg}) = \frac{A}{P} \quad (3)$$

onde A é a atividade hidrolítica (U/mL) e P é a concentração de proteína (mg/mL).

O fator de purificação (FP) foi calculado conforme a Eq. (4):

$$FP = \frac{AE_f}{AE_i} \quad (4)$$

onde AE_f é a atividade específica final (U/mg) obtida após a precipitação e AE_i é a atividade específica inicial (U/mg) do extrato bruto antes da purificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados da purificação da lipase de *Geotrichum candidum* por precipitação com acetona.

Tabela 1. Parâmetros de purificação da lipase de *Geotrichum candidum* por precipitação com acetona.

AR (%)	PR (%)	AE_i (U/mg)	AE_f (U/mg)	FP
94,89	91,15	336,71 ± 4,52	349,41± 3,84	1,28

AR: atividade recuperação; PR: proteína recuperada; AE_i: atividade específica inicial; AE_f: atividade específica final; FP: fator de purificação.

A atividade recuperada (AR) foi de 94,89%, indicando que a maior parte da atividade catalítica presente no extrato bruto foi preservada durante o processo de precipitação. A proteína recuperada (PR) atingiu 91,15%, demonstrando que houve retenção significativa das proteínas presentes na amostra. A atividade específica inicial (AE_i) foi de 336,71 ± 4,52 U/mg, enquanto a atividade específica final (AE_f) alcançou 349,41 ± 3,84 U/mg. O aumento observado na atividade específica foi de aproximadamente 12,7 U/mg, resultando em um fator de purificação (FP) de 1,28.

Embora lipases sejam, em geral, mais tolerantes a solventes orgânicos do que outras hidrolases, sua estabilidade operacional ainda depende fortemente das condições do meio, em especial da temperatura e do tempo de exposição (Maldonado et al., 2016). Nesse contexto, a precipitação com acetona é uma estratégia reconhecida para concentrar e purificar lipases do gênero *Geotrichum candidum*. Oliveira et al. (2018), por exemplo, relataram 100% de recuperação da atividade da lipase de *Geotrichum candidum* ao utilizarem acetona a 8 ºC, na proporção de 2:1 (solvente:caldo), o que evidencia a forte influência da temperatura sobre o desempenho do processo. Ainda assim, a eficiência do método pode variar conforme a cepa e as condições aplicadas, o que reforça a necessidade de padronização rigorosa para garantir reprodutibilidade.

A temperatura da acetona é um fator crítico na precipitação enzimática. Temperaturas baixas reduzem a mobilidade molecular e a atividade da água no meio, o que favorece a agregação e precipitação das proteínas sem alterar sua estrutura. O uso de acetona em temperaturas inadequadas pode desnaturar parcialmente a enzima, expor regiões hidrofóbicas e prejudicar a conformação necessária para a atividade catalítica. Isso reduz a atividade recuperada e a estabilidade da lipase após a purificação. Portanto, o uso de acetona resfriada é essencial para evitar danos à proteína e preservar sua funcionalidade (Scopes, 1994; Maldonado et al., 2016).

Os altos valores de recuperação deste estudo mostram que as duas precipitações consecutivas com acetona recuperaram a lipase de forma eficiente e preservaram sua atividade catalítica. A recuperação de 94,89% demonstra que a exposição repetida ao solvente não causou perda significativa da atividade, o que evidencia a estabilidade da lipase nas condições usadas.

O fator de purificação de 1,28 confirma o aumento da atividade específica após as precipitações, indicando enriquecimento da preparação enzimática. Embora o ganho tenha sido moderado, esse comportamento é comum em processos de purificação com solventes orgânicos, cuja função principal é concentrar a enzima e remover parte dos componentes do extrato bruto. Segundo Scopes (1994), a precipitação tem menor seletividade do que as técnicas cromatográficas, sendo usada frequentemente como etapa inicial de purificação.

A realização de duas precipitações consecutivas tornou a alta recuperação da atividade ainda mais relevante, pois o protocolo aumentou o grau de purificação sem comprometer a funcionalidade da enzima. Esse resultado é importante para aplicações posteriores, como a imobilização enzimática, na qual a manutenção da atividade catalítica é um requisito fundamental para o desempenho do biocatalisador (Ferreira et al., 2018).

CONCLUSÃO

A purificação da lipase de *Geotrichum candidum* por precipitação com acetona a 10 ºC proporcionou elevada recuperação da atividade enzimática (94,89%) e fator de purificação de 1,28, o que evidencia a concentração da enzima e a preservação da sua atividade catalítica. Embora o aumento na atividade específica tenha sido discreto, os resultados indicam que o protocolo empregado recuperou a lipase com mínima perda de atividade, constituindo uma etapa adequada para sua obtenção a partir do caldo de cultivo. Dessa forma, a preparação enzimática obtida apresenta potencial para aplicação em processos de imobilização, contribuindo para o desenvolvimento de biocatalisadores com interesse biotecnológico e industrial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e

a UNIFAL- MG pelo apoio para a realização do presente trabalho.

REFERÊNCIAS

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

Carvalho, A. K. F.; Bento, H. B. S.; Reis, C. E. R.; De Castro, H. F. Esterification Process in Supercritical Carbon Dioxide Catalyzed by *Geotrichum candidum* Lipase Produced with Mozzarella Cheese Whey and Corn Steep Liquor. **Processes**, v. 12, p. 2086, 2024.

Castro, A. M.; Castilho, L. R.; Freire, D. M. G. Production and optimization of lipase from *Geotrichum candidum* using cottonseed oil as inducer. **Biochemical Engineering Journal**, v. 113, p. 1-8, 2016.

Chandra, P.; Enespa; Singh, R.; Arora, P. K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, p. 169, 2020.

Cong, W.; Luo, X.; Zhang, J.; Zhang, J. A comprehensive review of hydrophobic MOF design for lipase immobilization. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, p. 122371, 2026.

Ferreira, E. E. A.; Pereira, B. C.; Hirata, D. B. Precipitation Using Organic Solvents for Purifying Lipase from *Preussia africana*. **Biotechnology Journal International**, v. 27, n. 6, p. 12-21, 2023.

Ferreira, M. M.; Santiago, F. L. B.; Silva, N. A. G.; Luiz, J. H. H.; Fernández-Lafuente, R.; Mendes, A. A.; Hirata, D. B. Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 55-63, 2018.

Guajardo, N.; Schrebler, R. A. Upstream and Downstream Bioprocessing in Enzyme Technology. **Pharmaceutics**, v. 16, p. 38, 2024.

López-Gómez, J. P.; Venus, J. Biorefineries: A new concept for the sustainable production of chemicals and materials. **Fermentation**, v. 7, n. 2, p. 82, 2021.

KAMANSKI, A. M. B. Purificação de lipases fúngicas visando aplicação em tratamento de óleo residual de fritura. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim**, 2017.

Maldonado, R. R., Lopes, D. B., Aguiar-Oliveira, E., Kamimura, E. S., & Macedo, G. A. (2016). A review on *Geotrichum lipases*: production, purification, immobilization and applications. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, 30(4), 439-454.

Mendes, A. A.; Ferreira, M. M.; Hirata, D. B. Filamentous fungi as microbial cell factories for lipase production: current trends and future perspectives. **Process Biochemistry**, v. 137, p. 1-15, 2024.

Mladenoska, I. Isolation and Purification of Lipases from Geotrichum candidum Grown on a Sunflower Oil Waste as a Carbon Source. **Chemical Engineering Transactions**, v. 42, p. 49–54, 2014

Monteiro, H.; Meneses, L.; Paiva, A.; Galamba, N.; Duarte, A. R. C. A Perspective Towards More Sustainable Production of Biotechnologically Relevant Enzymes Using DESs. **Molecules**, v. 30, n. 19, p. 3915, 2025.

Morais, W. G.; Kamimura, E. S.; Ribeiro, E. J.; Pessela, B. C.; Cardoso, V. L.; Resende, M. M. 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.

Nisha, S. A.; Karthikeyan, R.; Ramadoss, G. Production and characterization of lipase from *Bacillus subtilis*. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives**, v. 3, n. 5, p. 1121-1124, 2012.

Ramos, E. Z.; Miotti Júnior, R. H.; Castro, P. F. et al. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 43-51, 2015.

Scopes, R. K. Protein Purification: Principles and Practice. 3. ed. Springer-Verlag, New York, 1994.

Silva, M. R. L. da; Ferreira, E. E. A.; Hirata, D. B. Preparação De Biocatalisadores Utilizando A Lipase De *Geotrichum candidum* Produzida Por Fermentação Submersa . **REVISTA FOCO**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. e8460, 2025.

Singhania, R. R.; Sukumaran, R. K.; Patel, A. K.; Larroche, C.; Pandey, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. Enzyme and Microbial Technology, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

Souza, K. S. T.; Ramos, E. Z.; Hirata, D. B.; Mendes, A. A. Production, purification and immobilization of lipase from *Geotrichum candidum* using agroindustrial residues. **Biocatalysis and**

Agricultural Biotechnology, v. 15, p. 364-371, 2018.