



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

PRODUÇÃO DE LIPASE A PARTIR DE LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS ISOLADAS DO BAGAÇO DE CAJU.

M. F.M. de Freitas¹, S. Rodrigues², E. J. Gudiña³, L. R. Rodrigues³, L. R. B. Gonçalves¹

¹Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

²Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Alimentos

³Universidade do Minho, Departamento de Engenharia Biológica

E-mail para contato: fatfrei@gmail.com; lrgufc@gmail.com

RESUMO – As lipases (E.C. 3.1.1.3) são uma classe de enzimas que catalisam a hidrólise dos triglicerídeos de ácidos gordos livres e glicerol. Essas enzimas encontram uma grande aplicação nas indústrias de alimentos, detergentes, cosméticos, síntese orgânica e farmacêutica. Neste trabalho, as leveduras *Candida tropicalis* e *Meyerozyma caribbica* isoladas do bagaço de caju foram testadas quanto à sua capacidade de produção de lipase. As fermentações foram conduzidas em agitador rotatório a 30 °C e 170 rpm. A medida da atividade foi feita através da hidrólise com o pNFL (p-nitrofenil laurato). Para a produção da enzima foi utilizado um meio de cultura contendo resíduos agroindustriais, nomeadamente melão 10 g/L, milhocina 4 g/L, águas russas 1,0 % (v/v). A atividade do sobrenadante da *C. tropicalis* foi 233 ± 10 U/L e da *M. caribbica* foi $146 \pm 7,30$ U/L em 24 h de fermentação. Esses resultados mostram o potencial dessas estirpes para a produção da enzima lipase a partir de resíduos agroalimentares.

1. INTRODUÇÃO

As lipases catalisam uma variedade de reações, fazem hidrólise parcial ou completa de triacilgliceróis e reações de esterificação, transesterificação e interesterificação de lípidos (Cola *et al.*, 2010). Estas enzimas têm recebido grande atenção como biocatalisadores industriais, em várias áreas como a de óleos e processamento de gorduras, detergentes, panificação, fabricação de queijos, limpeza da superfície ou na química fina (Bassegoda *et al.*, 2012).

As lipases microbianas estão amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade do substrato que as tornam muito atraentes para aplicações industriais (Kumar *et al.*, 2011). Estas enzimas são produzidas preferencialmente por fermentação submersa e para essa produção, o meio de cultura utilizado é muito importante (Takac *et al.*, 2010). Meios de culturas contendo resíduos agrícolas representam recursos potenciais para uso em processos biotecnológicos principalmente devido ao seu baixo custo, acessibilidade e composições com nutrientes que contenham carbono, nitrogênio e minerais (Salihu *et al.*, 2012; Mussatto, 2009; Graminha *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2000).

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



Neste contexto, este trabalho tem por objetivo avaliar a produção de lipases por leveduras (*Candida tropicalis* e *Meyerozyma caribbica*) isoladas a partir do bagaço de caju utilizando meios de cultura contendo resíduos agroindustriais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microorganismo

As leveduras *Candida tropicalis* e *Meyerozyma caribbica* foram doadas pelo Laboratório de Biotecnologia (Labiotec) da Universidade Federal do Ceará e armazenados em tubos contendo Agar Batata Dextrose (SIGMA).

2.2. Resíduos

Melaço proveniente das Refinarias de Açúcar Reunidas, S.A. (Portugal)), milhocina da Companhia Portuguesa de Amidos, S.A. (Portugal) e águas russas do processo de extração do azeite na Região Norte de Portugal.

2.3. Composição dos meios com resíduos:

A Tabela 1 mostra a composição dos 4 meios de cultura. Além destes, estes meios contém sulfato de amônia (0,5 g/L) e peptona (3 g/L).

Tabela 1 - Composição dos meios com resíduos para produção da lipase

Nutrientes	Carbono (10 g/L)	Nitrogênio (4 g/L)	Indutor 1 % (v/v)
Meio 1	Melaço	Extrato de levedura	ácido oléico
Meio 2	Glicose	Milhocina	ácido oléico
Meio 3	Glicose	Extrato de levedura	Águas russas
Meio 4	Melaço	Milhocina	Águas russas

2.4. Condições de fermentação

O meio de inóculo foi preparado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do mesmo meio a usar na fermentação submersa. 4. O inóculo foi de 5 % no meio de cultivo e consistia em (g/l): glicose 20; peptona 10; extrato de levedura 4; ácido oléico 0,5 % v/v em



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0. A fermentação foi conduzida em um agitador rotativo a 30 °C e 170 rpm por 48 horas.

2.5. Extração da Enzima

As células obtidas por centrifugação (10.000 g por 15 minutos a 4 °C) foram lavadas uma vez com 20 mL de água destilada. O sobrenadante após separação das células foi analisado quanto à sua atividade enzimática extracelular. Após a lavagem, o pellet de células foi ressuspenso em tampão fosfato de sódio a 25 mM e pH 7 até uma concentração celular de 0,1 mg/mL. As células foram rompidas para obter o extrato enzimático da *C. rugosa* usando o ultrassom por 2 min com pulsos de 30 seg e intervalos de 10 s. Após o rompimento, procedeu-se à uma centrifugação a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi analisado quanto à sua atividade enzimática.

2.6. Métodos analíticos

Atividade enzimática da lipase: Para o preparo do substrato foi utilizado o método descrito por Brígida, 2010. Para a medida da atividade foi utilizado o método em microplacas descrito por Abrunhosa et al. (2012) com ligeiras modificações.

Concentração de biomassa: A concentração celular foi determinada através da análise da DO (densidade ótica). A densidade ótica foi acompanhada por espectrofotometria a 600 nm e a concentração de biomassa, em g/L, foi determinada através da curva de calibração.

Concentração de proteína: Determinada pelo método colorimétrico de Bradford, no qual se emprega o corante azul de Comassie (Bradford, 1976).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Produção de lipase por *Candida tropicalis* em meios alternativos contendo resíduos

Na Tabela 2, observam-se os resultados em 4 meios alternativos testados para a *C. tropicalis*. O único meio que permitiu a produção de lipase intracelular por *C. tropicalis* foi o meio 4. Esta levedura produziu lipase com atividade intracelular de 110 ± 10 U/L para 24 h de fermentação e $140 \pm 0,0$ U/L para 48 h. É observado que nesse meio a quantidade de proteína intracelular produzida pela *C. tropicalis* foi maior do que nos outros meios. No meio 2 a *C. tropicalis* também produziu uma quantidade de proteína próxima ao do meio 4, mas não obteve a produção de lipase.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



Tabela 2: Atividade intracelular e proteína produzida pela *C. tropicalis* utilizando 4 meios com resíduos em 24 h e 48 h.

Meio de cultura	Atividade do intracelular (U/L) 24 h	Atividade intracelular (U/L) 48 h	Proteína Intracelular (g/L) 24 h	Proteína Intracelular (g/L) 48 h
1	-	-	0,239 ± 0,01	0,467 ± 0,00
2	-	-	1,070 ± 0,04	0,876 ± 0,01
3	-	-	0,553 ± 0,00	0,755 ± 0,00
4	110 ± 10	140 ± 0,0	1,22 ± 0,11	1,74 ± 0,57

3.2 Produção de lipase por *Meyerozyma caribbica* em meios alternativos contendo resíduos

Na Tabela 3 estão os resultados para o crescimento e produção de lipases por *Meyerozyma caribbica* nos 4 meios alternativos.

Tabela 3: Atividade intracelular e proteína produzida pela *Meyerozyma caribbica* utilizando 4 meios com resíduos em 24 h e 48 h.

Meio de cultura	Atividade do intracelular (U/L) 24 h	Atividade intracelular (U/L) 48 h	Proteína Intracelular (g/L) 24 h	Proteína Intracelular (g/L) 48 h
1	-	-	1,182 ± 0,10	1,135 ± 0,12
2	-	165 ± 10	1,445 ± 0,26	1,487 ± 0,55
3	-	-	1,269 ± 0,09	1,943 ± 0,05
4	154 ± 13	117 ± 9	1,302 ± 0,06	1,035 ± 0,02

Para a *Meyerozyma caribbica* os meios 2 e 4 propiciaram a produção de lipase. No entanto, no meio 4 a produtividade foi maior (6,41 U/L.h) quando comparada à produtividade no meio 2 (3,43 U/L.h). O meio 2 também possui em sua composição milhocina. A presença da milhocina torna o meio 2 rico em nutrientes o que pode ter favorecido a produção de lipase pela levedura *M. caribbica*, mas isso não ocorreu para *C. tropicalis*. Observa-se também que a *C. tropicalis* produziu menos proteína intracelular que a outra levedura em 24 h de fermentação, no entanto a atividade extracelular da lipase produzida foi maior como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4: Atividade enzimática extracelular para as leveduras *C. tropicalis* e *Meyerozyma caribbica* no meio 4.

	<i>C. tropicalis</i>	<i>M. caribbica</i>
Tempo (h)	Meio 4 (U/L)	Meio 4 (U/L)
24	233 ± 10	146 ± 7,30
48	355 ± 20	-

Observa-se que a *C. tropicalis* em 24 h a atividade da lipase extracelular foi 233 ± 10 U/L e da *M. caribbica* foi 146 ± 7,30 U/L. Isso mostra que a *C. tropicalis* produziu mais lipase extracelular que a *M. caribbica*. Para a *C. tropicalis* o resultado foi melhor às 48 h.

Em 24 h a *M. caribbica* teve produção de lipase, mas em 48 h não houve produção. Pode-se perceber que ocorreu alguma desnaturação da enzima nas últimas 24 h.

Na literatura outros meios de cultura são testados na produção de lipase. No trabalho de Bussumara *et al.* (2010) foi utilizado um meio com glicose (2,0 g /L), peptona (5,0 g /L), MgSO₄ (0,1 g /L) e K₂HPO₄ (1,0 g /L) suplementado com óleo de soja (20,0 g /L) ou de gordura de bovina (20,0 g /L) para produção de lipase a partir da cerpa *P. hubeiensis* HB85. Os resultados de atividade foram 610 U/L em gordura bovina e 386 U/L em óleo de soja. Essas atividades foram maiores que a deste trabalho, porém esse meio utilizado por eles foi mais dispendioso, uma vez que se utilizou componentes sintéticos e uma fonte indutora provinda de alimentos.

3.3 Biomassa *C. tropicalis* e *Meyerozyma caribbica*

A Figura 1 mostra a curva de crescimento das leveduras *C. tropicalis* e *Meyerozyma caribbica* no meio 4. Como pode ser visto a levedura *C. tropicalis* e a levedura *Meyerozyma caribbica* tiveram crescimento semelhante.

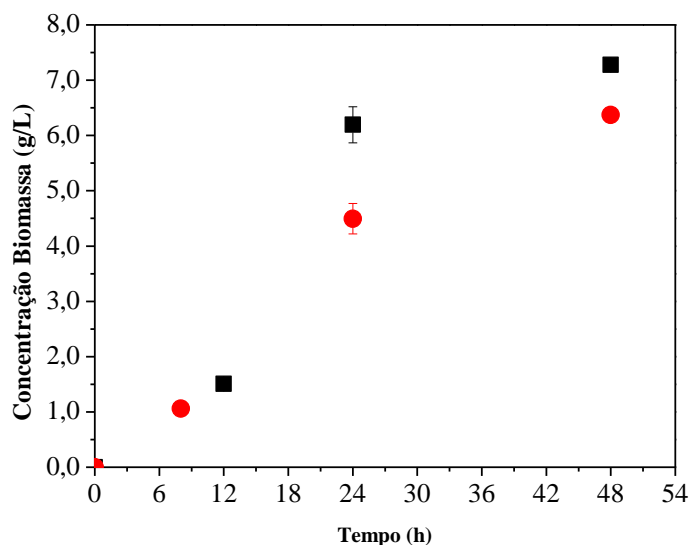


Figura 1: Biomassa para *C. tropicalis* e *Meyerozyma caribbica* no meio 4 composto por melaço, milhocina e águas russas.

Apesar das duas cepas terem crescido bem, é ainda necessário proceder à otimização do meio 4 com o objetivo de redução de custos no processo de fermentação e aumento no rendimento da produção da enzima lipase.

4. CONCLUSÕES

O meio de cultura contendo melaço, milhocina e águas russas foi adequado para a produção de lipase a partir das leveduras *C. tropicalis* e *M. caribbica*. Para a levedura *M. caribbica* a atividade do extracelular foi inferior que a atividade produzida pela *C. tropicalis*, novos experimentos precisam ser feitos para otimização do meio 4 fim de melhorar a produção da lipase nessas leveduras.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa Ciências sem Fronteiras e ao Laboratório de Fermentação da Universidade do Minho. Também pelo apoio financeiro dos órgãos CAPES, CNPq e FUNCAP.

6. REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, L., OLIVEIRA, F., DANTAS, D., GONÇALVES, C., & BELO, I. Lipase production by *Aspergillus ibericus* using olive mill wastewater. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(3), 285-291, 2013.



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

BASSEGODA, A., CESARINI, S., & DIAZ, P. Lipase improvement: goals and strategies. *Computational and structural biotechnology journal*, 2(3), 1-8, 2012.

BRÍGIDA, A. I. S. Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais (Doctoral dissertation, Tese. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 197p), 2010.

BRADFORD, MARION 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.

BUSSAMARA, R., FUENTEFRIA, A. M., DE OLIVEIRA, E. S., BROETTO, L., SIMCIKOVA, M., VALENTE, P., & VAINSTEIN, M. H. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource Technology*, 101(1), 268-275, 2010..

COLLA L. M., RIZZARDI J., PINTO M. H., REINEHR C. O., BERTOLIN T. E., VIEIRA COSTA J.A. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresour Technol* 101:8308–14, 2010.

GRAMINHA E.B.N., GONCALVES A.Z.L., PIROTA R.D.P.B., BALSALOBRE M.A.A., SILVA R. D., GOMES E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. *Anim Feed Sci Technol* 144:1–22, 2008.

KUMAR, A., & KANWAR, S. S Synthesis of ethyl ferulate in organic medium using celite-immobilized lipase. *Bioresource Technology*, 102(3), 2162-2167, 2011.

MUSSATTO, S. I. Biotechnological potential of brewing industry by-products. In: *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation*. Springer Netherlands, p. 313-326., 2009.

PANDEY A, SOCCOL C. R., MITCHELL D. New developments in solid state fermentation I-bioprocesses and Products. *Process Biochem*, 35:1153–69, 2000.

TAKAÇ, S., ÜNLÜ, A. E., ERDEM, B.. Oxygen transfer strategy modulates the productions of lipase and esterase enzymes by *Candida rugosa*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* v. 64, n. 3, 150-154, 2010.

SALIHU, A., ALAM, M. Z., ABDULKARIM, M. I., & SALLEH, H. M. Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 58, 36-44, 2012.

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO

