



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 *Candida rugosa* NRRL Y-95 UTILIZANDO MEIO DE CULTURA CONTENDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.

M. F.M. de Freitas¹, E. J. Gudiña², S. C. Silvério², L. R. Rodrigues², L. R. B. Gonçalves¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

² Universidade do Minho, Departamento de Engenharia Biológica

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

RESUMO – As lipases (E.C. 3.1.1.3) são um grupo de enzimas capazes de catalisar a hidrólise da ligação éster de triacilgliceróis, gerando ácidos graxos livres e glicerol. As lipases microbianas são muito utilizadas nas aplicações industriais nas áreas de alimentos, síntese orgânica e farmacêutica. Neste trabalho, visando à produção de lipase a partir da levedura *Candida rugosa* foram utilizados meios de cultura alternativos compostos por melaço, milhocina e águas russas. As fermentações foram conduzidas em agitador rotatório a 30 °C e 170 rpm. Testaram-se quatro meios contendo diferentes combinações dos resíduos acima mencionados. O meio contendo melaço 10 g/L, milhocina 4 g/L e águas russas 1,0 % (v/v) foi o que propiciou a produção de enzima com maior atividade intracelular 269 ± 10 U/L frente ao substrato pNFL (p-nitrofenil laurato). Esses resultados demonstram que o referido meio alternativo contendo resíduos agroindustriais é adequado para a produção de lipase.

1. INTRODUÇÃO

As lipases são a classe de enzimas mais utilizadas em biotecnologia (Ribeiro *et al.*, 2011; Schmid *et al.*, 1998). De acordo com o mais recente relatório lançado pela Freedonia Group (Daiha *et al.*, 2015), em 2014 a procura mundial de lipases foi projetada para aumentar 6,2% anualmente.

As lipases microbianas estão sendo produzidas preferivelmente em fermentações submersas (Messias *et al.*, 2011). A literatura apresenta diversos trabalhos sobre produção da lipase (Montesinos *et al.*, 2003; Rajendran & Thangavelu, 2007; Takaç *et al.*, 2010), nos quais são avaliados meios de cultura sintéticos com vitaminas. Como forma de minimizar custos de produção, meios de cultura ricos em nutrientes formulados com resíduos podem ser explorados. Neste trabalho foram testados três resíduos agroindustriais: o melaço, a milhocina e as águas russas.

O melaço é um subproduto de baixo custo gerado durante a cristalização do açúcar a partir de extratos líquidos da cana ou da beterraba. Ele contém uma elevada concentração de carboidratos (geralmente cerca de 50%), bem como outros compostos de valor agregado, tais como as vitaminas



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

(Gudina *et al.*, 2015). O custo desse subproduto é 200 euros/toneladas segundo a RAR (Refinarias de Açúcar Reunidas, S.A. Portugal).

A milhocina é um subproduto líquido gerado pela indústria de processamento do milho. É rica em vitaminas, minerais, aminoácidos e proteínas, sendo uma importante fonte de nitrogênio para muitos processos biotecnológicos (Henkel *et al.*, 2012; Maddipati *et al.*, 2011). O custo desse subproduto é 40 euros/toneladas segundo a COPAM (Companhia Portuguesa de Amidos, S.A. Portugal).

As águas russas são um resíduo líquido gerado no processo de extração do azeite. Os seus principais componentes são água (83-94%), lipídeos, carboidratos, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, taninos, pectinas e minerais (Gudina *et al.*, 2016).

Este trabalho teve como objetivo encontrar um meio de cultura de baixo custo que permita produzir a lipase a partir da levedura *Candida rugosa* NRRL Y-95.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

A espécie *Candida rugosa* NRRL Y-95 foi doada pelo USDA (United States Department of Agriculture) pertencentes a coleção de cultura da ARS (Agricultural Research Service). As culturas foram ativadas em placas de cultura contendo ágar batata dextrose (SIGMA) a 30 °C durante 48 h e depois mantida a 4 °C por até dois meses.

2.2. Resíduos

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

2.3. Composição dos meios sintéticos

Foram testados três meios sintéticos para produção da lipase a partir de *C. rugosa* conforme Tabela 1. Em seguida foi testado o meio que melhor permitiu a produção de lipase diluído em uma solução de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0.

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



Tabela 1- Composição dos meios sintéticos para produção da lipase.

Componentes	Meios de cultura		
	A (g/L)	B (g/L)	C (g/L)
Glicose	1	10	20
NaNO ₃		1	-
Peptona	-	-	3
KH ₂ PO ₄	1	1	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	0,5	0,5
Extrato de levedura	70	70	4
Ácido Oléico (v/v)	3 %	3 %	1%

2.4. Composição dos meios formulados com resíduos

A Tabela 2 mostra a composição dos 4 meios de cultura. Todos estes meios contém sulfato de amônia (0,5 g/L) e peptona (3 g/L).

Tabela 2 - 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 oleico
Meio 2	Glicose	milhocina	Ácido oléico
Meio 3	Glicose	Extrato de levedura	Águas russas
Meio 4	Melaço	milhocina	Águas russas

2.5. Condições de fermentação

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

2.6. 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 ressuscitado em tampão fosfato de sódio a 25 mM e pH 7,0 até uma concentração celular de 0,1 mg/mL. As células foram rompidas para obter o extrato enzimático da *C. rugosa* usando o ultrassons por 2 min com pulsos de 30 seg e intervalos de 10 seg. 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.

2.7. 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. Estudo dos meios sintéticos

Os resultados na Tabela 3 mostram que dois dos meios sintéticos estudados (B e C) foram satisfatórios para a produção da lipase, sendo o meio C, o escolhido por sua composição ter um custo inferior aos outros. Pode ser visto também que a glicose não chega a ser toda consumida, então ela foi reduzida para a quantidade proposta no meio B.

Tabela 3 – Meios sintéticos para a produção da lipase por *Candida rugosa* em 72 h.

Meios	Atividade extracelular (U/mL)	Atividade intracelular (U/mL)	Açúcar residual (g/L)	Proteína (g/L)
A	-	60 ± 0,00	-	0,152 ± 0,00
B	155 ± 10	105 ± 40	2,360 ± 0,11	0,850 ± 0,03
C	116 ± 50	60 ± 10	5,100 ± 0,25	1,121 ± 0,01

A Figura 1 abaixo mostra o resultado do meio C em tampão fosfato de potássio pH 7,0. Observa-se uma maior atividade de lipase produzida que no meio anterior. Isso pode ter acontecido, porque no meio tamponado não houve desnaturação da enzima lipase no decorrer da fermentação.

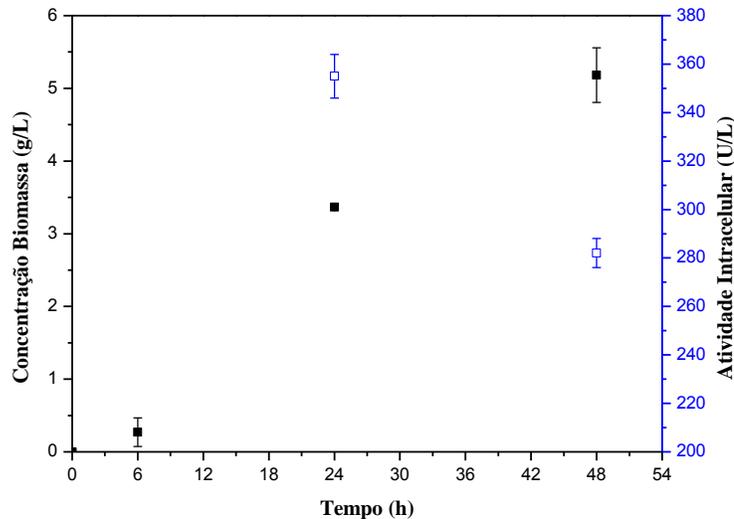


Figura 1 – Resultados de biomassa ■ e atividade enzimática intracelular □ para *Candida rugosa* cultivada em meio sintético C.

Observa-se na Figura 1 que esse meio C com tampão fosfato de potássio pH 7,0 permitiu a produção de lipase com uma atividade intracelular 355 ± 13 U/L e a 282 ± 14 U/L em 24 h e 48 h de fermentação, respectivamente. A atividade extracelular se manteve constante entre 24 e 48 h no valor de 172 ± 15 .

Então dessa forma, a composição do meio sintético que permitiu a produção de lipase continha glicose (10 g/L), extrato de levedura (4 g/L) e ácido oleico (1% v/v) como indutor, além de sulfato de amônio (0,5 g/L) e peptona (3 g/L) em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0.

No trabalho de Wei *et al.*, 2004 foi produzida a lipase a partir de *C. rugosa* em um meio composto por sais e vitaminas. Em relação a este trabalho, esse meio foi mais oneroso, pois meios com micronutrientes tem custo mais elevados.

3.2. Produção de lipase por *Candida rugosa* em meios alternativos contendo resíduos

Como pode ser observado na Tabela 4, a maior quantidade de lipase produzida em 24 h foi 561 ± 30 U/L no meio de cultura 4. Em 48 h, a atividade do sobrenadante da lipase produzida pela *C. rugosa* no mesmo meio diminuiu (399 ± 16) e atividade intracelular manteve-se (269 ± 10 U/L).

Tabela 4 - Resultado da produção de lipase a partir da *C. rugosa* utilizando meios com resíduos em 24 h de fermentação.

Meio de cultura	Concentração biomassa (g/L)	Atividade extracelular (sobrenadante) (U/L)	Atividade intracelular (U/L)	Atividade específica intracelular (U/g)
1 (melaço, ácido oleico)	$3,63 \pm 0,04$	143 ± 20	214 ± 10	164 ± 30
2 (CSL, ácido oleico)	$4,88 \pm 0,03$	424 ± 20	$95 \pm 0,00$	79 ± 11
3 (glicose, extrato de levedura, águas russas)	$4,83 \pm 0,39$	213 ± 10	165 ± 30	287 ± 40
4 (melaço, CSL, águas russas)	$4,39 \pm 0,04$	561 ± 30	269 ± 10	$331 \pm 0,00$

Com esse resultado, o meio 4 foi escolhido para a produção de lipase a partir da *C. rugosa* em um tempo de 24 h, pois a atividade foi maior que em 48 h.

O meio 4 por ser um meio que contém melaço e milhocina, ou seja, um meio muito rico em carboidratos (melaço) e até mesmo vitaminas (milhocina), favoreceu a produção da lipase. Esse meio possui ainda águas russas que, por ser um rejeito da indústria do azeite, possui ácido oléico servindo como um indutor para produção de lipase.

De acordo com Takaç *et al.* (2010) a produção de lipase por *Candida rugosa* em seu trabalho resultou em dois tipos de lipases produzidas extra e intracelular. Esse trabalho assemelhou-se a este que também obteve atividade intracelular e extracelular.

No trabalho reportado por Rajendran e Thangavelu (2007), a atividade extracelular máxima alcançada foi 5,95 U/mL para a lipase obtida da *C. rugosa* NCIM 346. O meio utilizado possuía componentes sintéticos com óleo de amendoim além de vitaminas. Resultado similar a este trabalho, mostrando um meio rico em nutrientes e um óleo servindo como indutor para a produção da lipase.



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

4. CONCLUSÕES

A *C. rugosa* foi capaz de produzir a lipase em um meio sintético composto por glicose, peptona, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, extrato de levedura e ácido oléico em tampão fosfato de potássio pH 7,0. A lipase também foi produzida no meio de cultura 4 composto por melaço, milhocina e águas russas com atividade intracelular de 269 ± 10 U/L, mostrando que esses resíduos podem potencialmente ser aplicados para esse tipo de produção, reduzindo significativamente os custos de matéria-prima.

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.

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.

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.

DAIHA, K. D. G., ANGELI, R., DE OLIVEIRA, S. D., & ALMEIDA, R. V. Are lipases still important biocatalysts? A study of scientific publications and patents for technological forecasting. *PloS one*, 10(6), 2015.

FREEDONIA GROUP. *World Enzyme Report*. 2014.

GUDIÑA, E. J., RODRIGUES, A. I., ALVES, E., DOMINGUES, M. R., TEIXEIRA, J. A., & RODRIGUES, L. R.. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. *Bioresource technology*, v. 177, 87-93, 2015.

GUDIÑA, E. J., RODRIGUES, A. I., DE FREITAS, V., AZEVEDO, Z., TEIXEIRA, J. A., & RODRIGUES, L. R.. Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. *Bioresource Technology*, v. 212, 144-150, 2016.

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

HENKEL, M., MÜLLER, M.M., KÜGLER, J.H., LOVAGLIO, R.B., CONTIERO, J., SYLDATK, C., HAUSMANN, R.. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process Biochem*, v. 47, 1207–1219, 2012.

MADDIPATI, P., ATIYEH, H.K., BELLMER, D.D., HUHNE, R.L.. Ethanol production from syngas by Clostridium strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. *Bioresour. Technology*, v. 102, 6494–6501, 2011.

MESSIAS, J. M., DA COSTA, B. Z., DE LIMA, V. M. G., GIESE, E. C., DEKKER, R. F. H., & BARBOSA, A. D. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 32(2), 213-234, 2011.

MONTESINOS, J. L., DALMAU, E., CASAS, C. Lipase production in continuous culture of *Candida rugosa*. *J. Chem Technol and biotechnol.* v. 78, n. 7, 753-761, 2003.

RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V.. Optimization of medium composition for lipase production by *Candida rugosa* NCIM 3462 using response surface methodology. *Canadian journal of microbiology*, v. 53, n. 5, p. 643-655, 2007.

RIBEIRO B. D. , CASTRO A. M. D., COELHO M. A. Z. , FREIRE D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Res*, 2011.

SCHMID, R. D.; VERGER, R.. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 37, n. 12, p. 1608-1633, 1998.

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.

WEI, D., ZHANG, L. Y., SONG, Q. Studies on a novel carbon source and cosolvent for lipase production by *Candida rugosa*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* v. 31, n. 3, 133-136, 2004.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO

