

## Produção e aplicação de lipases em resíduos têxteis

## Production and application of lipases in textile waste

**Ricardo de Sousa Rodrigues**

[rsrodrigues767@gmail.com](mailto:rsrodrigues767@gmail.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Milena Martins Andrade**

[milenaandrade@utfpr.edu.br](mailto:milenaandrade@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Patrícia Salomão Garcia**

[patriciagarcia@utfpr.edu.br](mailto:patriciagarcia@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Alessandra Machado Baron**

[alessandrab@utfpr.edu.br](mailto:alessandrab@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

### RESUMO

Lipases de *Penicilliumcorylophilum* foram produzidas por fermentação sólida, utilizando materiais de baixo custo e oriundos de resíduos da indústria têxtil como meio de cultivo (substrato). Além disso, utilizou-se o sólido fermentado contendo lipases em reações de síntese do oleato de etila com heptano (co-solvente). Dois meios de cultivo foram usados: a) farelo de semente de girassol (SG, 10 g) e b) farelo de semente de girassol e Fibroína (SGF) razão (5:5 m/m em g) ambos com umidade relativa de 55%; 29°C. Os frascos inoculados foram incubados em estufa a 29 °C e a cada 24 h (total de 168 h) retirou-se três frascos para dosagem da atividade enzimática no sólido fermentado. A atividade máxima (hidrólise do palmitato de p-nitrofenila) foi de  $82 \pm 14 \text{ U gSS}^{-1}$  e  $278 \pm 24 \text{ U gSS}^{-1}$  em 144 h para os meios SG e SGF respectivamente. O rendimento da síntese do oleato de etila utilizando o sólido fermentado SGF foi de  $50 \pm 17\%$  em 3 h, a 37°C e 150 rpm.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lipase. Fermentação sólida. Esterificação.

### ABSTRACT

*Penicilliumcorylophilum* lipases were produced by solid fermentation, using low cost materials and from textile industry residues as a culture medium (substrate). In addition, the fermented solid was used in ethyl oleate synthesis reactions with heptane (co-solvent). Two culture media were used: a) sunflower seed (SG, 10 g) and b) sunflower seed and Fibroin (SGF) ratio (5: 5 m / m in g) both with relative humidity of 55%; 29 ° C. The inoculated flasks were incubated in a stove at 29 °C and every 24 hours (total of 168 h) three bottles were taken for dosing of the enzymatic activity in the fermented solid. The maximum activity (hydrolysis of p-nitrophenylpalmitate) was  $82 \pm 14 \text{ U gSS}^{-1}$  and  $278 \pm 24 \text{ U gSS}^{-1}$  at 144 h for SG and SGF respectively. The yield of the ethyl oleate synthesis using the SGF fermented solid was  $50 \pm 17\%$  in 3 h, at 37 ° C and 150 rpm.

**KEYWORDS:** Lipase. Solid-fermentation. Esterification.

**Recebido:** 13 set. 2018.

**Aprovado:** 04 out. 2018.

#### Direito autoral:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases e estão associadas ao metabolismo, a hidrólise de lipídios, reações de esterificação, transesterificação, lactonização entre outras (GONÇALVES, 2007; RIGO et al., 2010; SALIHU et al., 2012; ANANTHI et al., 2018).

Um fator limitante para a utilização em escala industrial no setor de biocatálise das lipases microbianas tem sido o seu custo de produção, que é determinado pelo rendimento de produção, condições do processo e pela estabilidade da enzima. Uma das áreas de pesquisa envolvendo a produção de lipases está direcionada no uso de diferentes microrganismos, suplementos e substratos a fim de encontrar a melhor combinação para obter lipases utilizando condições operacionais que facilitem e reduzam o preço de produção (GONÇALVES, 2007; SALIHU et al., 2012). Um dos parâmetros mais importantes na produção de enzimas, através da fermentação no estado sólido (FES), é o tipo de substrato utilizado. Na FES, o microrganismo cresce em substratos sólidos umedecidos ou suportes inertes, na ausência (ou quase) de água livre. Neste caso, o microrganismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do substrato, consumindo-o e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas (MITCHELL et al., 2006). O material sólido é insolúvel e pode agir como suporte físico (imobilização por adsorção no próprio substrato) e como fonte de nutrientes.

Dentre os substratos mais usados na FES, os resíduos agroindustriais normalmente têm sido empregados, pois reduzem o custo da produção, agregam valor ao produto final, além de solucionar problemas associados à poluição ambiental (GEOFFRY e ACHUR, 2018). O casulo do bicho da seda é composto por duas proteínas, a fibroína e a sericina. A segunda é retirada através do processo de degomagem e a fibroína é a que dá origem à seda (YANG et al., 2013; ARAMWIT, SIRITIENTONG e SRICHANA, 2010). Casulos do bicho da seda defeituosos tendem a ser utilizados na fabricação de fios de segunda e terceira linha, matéria prima na fabricação de cachecóis e outros artigos artesanais ou simplesmente descartados (SANTOS, VIDIGAL E MERLINI, 2011). Por se tratar de um material com características interessantes como tolerância térmica, excelentes propriedades mecânicas e absorção de água (ZHU, IMADA e ASAKURA, 2009; ARAMWIT, SIRITIENTONG e SRICHANA, 2010), o aproveitamento de casulos defeituosos em processos biotecnológicos, assim como os resíduos agroindustriais, torna-se interessante, pois agregaria valor ao produto final.

Tendo em vista a possibilidade de utilizar meios de cultivo de baixo custo bem como resíduos da indústria têxtil, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de lipases de *P. corylophilum* por FES utilizando farelo da semente de girassol e casulos do bicho da seda defeituosos. Após a produção, o sólido fermentado contendo lipases foi aplicado em reações de esterificação.

## MÉTODOS

O fungo *P. corylophilum* foi repicado em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), em erlenmeyers de 250 mL e incubados a 29°C por 7 dias. Para a fermentação foram utilizados erlenmeyers de 250 mL, com:(A) 10 g de farelo de semente de girassol (triturados, tamisados e embalados em sacos plásticos, sendo utilizadas

as frações com granulometria entre 0,8 e 2,0 mm de diâmetro);(B) 5 g de farelo de semente de girassol com 5 g de fibroína (casulo do bicho da seda degomado). Em ambos os casos os meios foram umedecidos com tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 7,0, para obter a umidade de 55%. Os cultivos foram iniciados pela adição de 1mL de suspensão de esporos ( $10^8 \text{ esp mL}^{-1}$ ) aos frascos de pré-inóculo. Os frascos inoculados foram incubados em estufa a  $29 \text{ }^\circ\text{C}$  e a cada 24 h retirou-se três frascos para dosagem da atividade enzimática do sólido fermentado. A composição centesimal do substrato foi realizada na UTFPR, Campus Apucarana (CAMARGO, 2015).

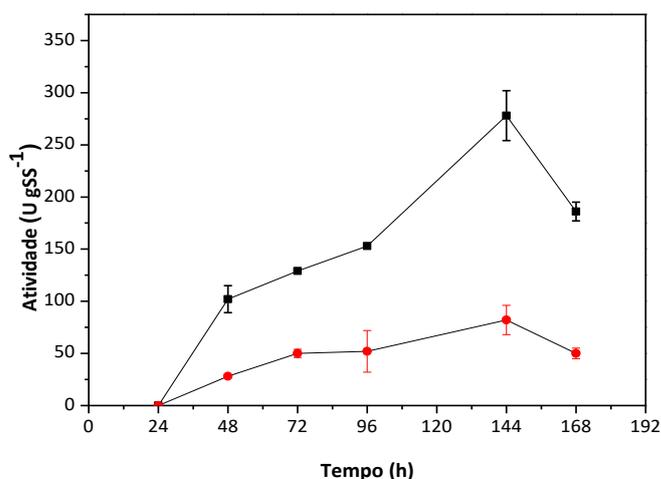
A atividade enzimática do sólido fermentado foi medida através da hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (pNPP) (WINKLER; STUCKMANN, 1979). Utilizou-se 10 mL da solução contendo pNPP e 10 mg do sólido fermentado. O meio reacional foi incubado a  $37^\circ\text{C}$ , e a cada minuto alíquotas de 1mL foram retiradas durante cinco minutos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Além das reações de hidrólise, o sólido fermentado foi aplicado em reações de síntese do oleato de etila. Para tal, utilizou-se erlenmeyers de 125 mL com 10 mL de heptano, 0,35 mg (100 U, pNPP) do sólido fermentado, 236  $\mu\text{L}$  de Ácido Oleico (150 mM) e 87  $\mu\text{L}$  de Etanol 95% (75mM) razão molar de (1:2), 3 h,  $37^\circ\text{C}$ , 150 rpm. As reações foram acompanhadas retirando-se alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  em diferentes intervalos de tempo por 3 h. O rendimento em éster (%) foi calculado pelo método de Lowry-Tinsley (1976).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à produção de lipases por *Penicilliumcorylophilum*, observa-se (Figura 1) que a maior atividade foi obtida em 144 h de fermentação para os dois meios sendo maior para o meio contendo a fibroína ( $278 \pm 24 \text{ U gSS}^{-1}$ ).

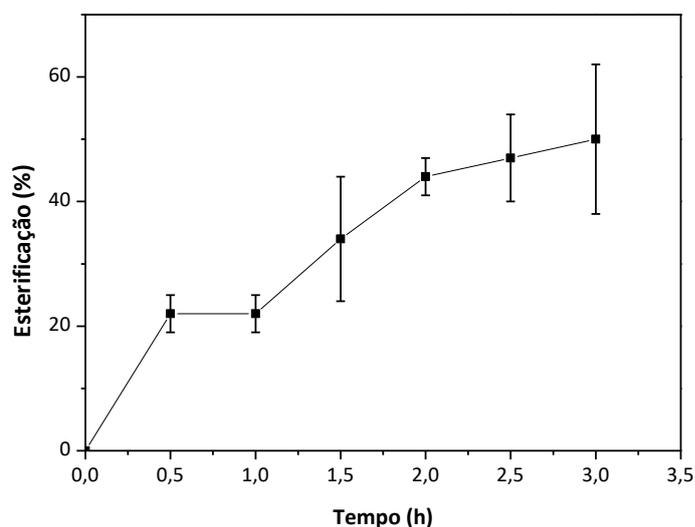
Figura 1 – Produção de lipase por *Penicilliumcorylophilum* em fermentação no estado sólido com farelo de semente de girassol (-■-) e farelo de semente de girassol com fibroína (1:1) (-●-). Atividade da hidrólise do pNPP. Experimentos realizados em triplicata.



Fonte: próprio autor (2018).

A conversão em éster (%), para as condições testadas, não foi observada quando se utilizou o sólido fermentado contendo somente semente de girassol. Para o fermentado contendo fibroína, a conversão foi de  $50 \pm 17$  % (Figura 2).

Figura 2 – Cinética da síntese do oleato de etilacatalisada pelo sólido fermentado contendo lipases de *Penicilliumcorylophilum*. Condições: 10 mL de heptano, 236  $\mu$ L de Ácido Oleico (150 mM) e 87  $\mu$ L de Etanol 95% (75 mM) razão molar de (1:2), 3 h, 150 rpm, 37 °C.



Fonte: próprio autor (2018).

Não há relatos na literatura, até o momento, da utilização da fibroína como substrato em fermentação sólida para a produção de lipases, porém há relatos da utilização de sólidos fermentados tanto em reações de hidrólise do pNPP como em esterificação do oleato de etila. Por exemplo, Fernandes et al. (2007) e Salum et al. (2010) observaram atividade máxima de  $108 \text{ U g}^{-1}$  (72 h, 29°C) e  $234 \text{ U g}^{-1}$  (96 h, 29 °C), frente a hidrólise do pNPP, para lipases de *Burkholderiacepacia* em FES usando respectivamente como substrato a torta de milho e farelo de semente de girassol com bagaço de cana (50:50; m/m). Os resultados obtidos neste trabalho, quanto a atividade frente à hidrólise do pNPP, foram superiores aos referenciados e portanto são promissores quanto a utilização do casulo do bicho da seda como substrato para o cultivo de lipases.

Para reações de esterificação, Agueiraset al. (2019) observaram conversão de 85% (4h) para o oleato de etila utilizando sólido fermentado contendo lipases de *Rhizomucormiehei* e semente de algodão como substrato. As condições reacionais foram ácido oleico: etanol 1:1 (total de 20 mL), 600 rpm, 40°C e 20% do sólido fermentado liofilizado.

Como as condições reacionais, para o presente trabalho, não estão otimizadas, outros experimentos devem ser realizados para verificar a possibilidade de maiores rendimentos em reações de esterificação.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível produzir lipases de *Penicilliumcorylophilum* por fermentação no estado sólido utilizando farelo de semente de girassol (SG) e farelo de semente de girassol com fibroína (SGF), sendo a maior atividade de  $278 \pm 24$  U gSS<sup>-1</sup> para SGF após 144 horas de cultura. Além disso, o sólido fermentado (SGF) foi capaz de catalisar a síntese do oleato de etila. A possibilidade de utilização de um resíduo da indústria têxtil na produção de lipases justifica a continuidade dos estudos.

## REFERÊNCIAS

AGUIEIRAS, E. C. G.; et al. Production of lipases in cottonseed meal and application of the fermented solid as biocatalyst in esterification and transesterification reactions. **Renewable Energy**, v.130, p. 574-581, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096014811830747X>> Acesso em:15 ago. 2018.

ARAMWIT, P.; SIRITIENTONG, T.; SRICHANA, T. Potential applications of silk sericin, a natural protein from textile industry by-products.**SageJournals**, v.30, p. 217-224, 2011. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0734242X11404733>> Acesso em 15 ago. 2018.

FERNANDES, M. L. M; et al. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 44, p. 8-13, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117706002505>> Acesso em: 12 ago. 2018.

GEOFFRY, k.; ACHUR, N.Screening and production of lipase from fungal organisms.**Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 241-253, 2018. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818117305674>> Acesso em: 22 ago. 2018.

GONÇALVES, F. A. F. **Produção de Lipases Extracelular Por Leveduras em Cultivo Submerso**. 2007. 66 f, Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007. Disponível em: <[http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/MBSA-794HNT/dissertacao\\_final.pdf?sequence=1](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/MBSA-794HNT/dissertacao_final.pdf?sequence=1)> Acesso em: 15 ago. 2018.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I.; Rapid colorimetric determination of free fatty acids.**Journal of American Oil Chemists Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.Disponível em:



<<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02636814>>Acesso em: 15 ago. 2018.

MITCHELL, D.A.; et al. A Complex Interaction of Phenomena. **The bioreactor Step of SSF** In: Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. Ed. Springer, p.13-32, Heidelberg, 2006. Disponível em: <[https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-31286-2\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-31286-2_2)> Acesso em: 12 ago. 2018.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 8184, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X02001213>> Acesso em: 12 ago. 2018.

RIGO, E.; et al. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1132-1137, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810000824>> Acesso em: 15 ago. 2018.

SALIHU, A.; et al. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921344911002187>> Acesso em: 15 ago. 2018.

SANTOS, S. A.; VIDIGAL, P. G.; MERLINI, L. S. A criação do Bombyx mori (Bicho-da-Seda) e as principais doenças. **Vetindex**, v. 14, p. 57-64, 2011. Disponível em: <[https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/arquivos-de-ciencias-veterinarias-e-zoologia-da-un/14-\(2011\)-1/a-criacao-do-bombyx-mori-bicho-da-seda-e-as-principais-doencas/](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/arquivos-de-ciencias-veterinarias-e-zoologia-da-un/14-(2011)-1/a-criacao-do-bombyx-mori-bicho-da-seda-e-as-principais-doencas/)> Acesso em: 15 ago. 2018.

ANANTHI, S.; et al. Optimization and purification of lipase through solid state fermentation by Bacillus cereus msu as isolated from the gut a marine fish Sardinella longipis. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 5, p. 291-298, 2014. Disponível em: <<https://innovareacademics.in/journal/ijpps/Vol6Issue5/9291.pdf>> Acesso em: 22 ago. 2018.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by Serratiamarcescens. **J. Bacteriol.**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/222724/>> Acesso em: 15 ago. 2018.



YANG, Y.; et al. Recovery of silk sericin from soap-alkaline degumming solution. **Korean Society of Sericultural Science**, v.27, p. 203-208, 2013. Disponível em:

<[http://www.koreascience.or.kr/article/ArticleFullRecord.jsp?cn=E1IEAM\\_2013\\_v27n1\\_203](http://www.koreascience.or.kr/article/ArticleFullRecord.jsp?cn=E1IEAM_2013_v27n1_203)> Acesso em: 22 ago. 2018.

ZHENGHUA, Z.; TAKUZO I.; TETSUO A. Preparation and characterization of regenerated fiber from the aqueous solution of Bombyxmori cocoon silk fibroin. **Materials Chemistry and Physics**, v. 117, p.430–433, 2009. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254058409003575>>

Acesso em: 12 ago. 2018.

### **AGRADECIMENTOS**

A Fundação Araucária pela concessão de bolsa.

A UTFPR – Câmpus Apucarana.