

## Produção de lipases por fermentação submersa utilizando resíduos da agroindústria

## Lipase production by submerged fermentation using agroindustrial residues

### RESUMO

**Guilherme Otávio Lima**  
[guilhermeoolimao@gmail.com](mailto:guilhermeoolimao@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

**Virgínia Sanches C. O. Trindade**  
[v.coelho23@hotmail.com](mailto:v.coelho23@hotmail.com)  
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

**Patrícia Salomão Garcia**  
[patriciagarcia@utfpr.edu.br](mailto:patriciagarcia@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Recebido:** 19 ago. 2020.

**Aprovado:** 01 out. 2020.

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



As enzimas são biocatalisadores que apresentam vantagens como alta especificidade e biodegradabilidade, atuam em ampla faixa de temperatura e pH, seletividade e eficiência. Dentre as enzimas utilizadas industrialmente, as lipases (EC 3.1.1.3; triacilglicerol acilhidrolases) se destacam por atuarem em diversas reações como hidrólise, aminólises, interesterificação, transesterificação, entre outras. Resíduos agroindustriais são ricos em nutrientes e servem para o cultivo de micro-organismos e produção de lipases. Este trabalho objetivou produzir lipases pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 por fermentação submersa utilizando resíduos agroindustriais. Os resíduos agroindustriais torta de soja (1, 2, 4 e 10 %, m/v), bagaço de malte, levedura e melaço (10, 12 e 14 %, m/v), foram utilizados como substratos para produção de lipases em meio contendo somente água destilada. Altos valores de atividade enzimática foram encontrados utilizando o substrato torta de soja, sendo que a máxima atividade ( $28,9 \pm 2,05$  U/mL) foi obtida com a concentração de 4 % (m/v) e 168 h. A utilização destes resíduos não só contribui para a sustentabilidade, mas também reduz os custos de produção destas enzimas, o que favorece a sua aplicação.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Botryosphaeria ribis* EC-01. Torta de soja. Bagaço de malte.

### ABSTRACT

Enzymes are biocatalysts that have advantages such as high specificity and biodegradability, act in a wide range of temperature and pH, selectivity and efficiency. Among the enzymes used industrially, lipases (EC 3.1.1.3; triacylglycerol acylhydrolases) have stood out for acting in several diverse reactions such as hydrolysis, aminolysis, interesterification, transesterification, among others. Agro-industrial residues are rich in nutrients and be used for the cultivation of microorganisms and lipases production. This work aimed to produce lipases by the fungus *Botryosphaeria ribis* EC-01 by submerged fermentation using agro-industrial residues. Agro-industrial residues soybean cake (1, 2, 4 and 10%, m/v), malt bagasse, yeast and molasses (10, 12 and 14%, m/v), were used as substrates for lipase production in medium containing only distilled water. High values of enzymatic activity were found using soybean cake substrate, and maximum activity ( $28.9 \pm 2.05$  U/mL) was obtained with 4% (m/v) concentration and 168 h. The use of these residues not only contributes to sustainability, but also reduces the production costs of these enzymes, which favors their application.

**KEYWORDS:** *Botryosphaeria ribis* EC-01. Soybean cake. Malt bagasse.

## INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas como catalisadores biológicos apresentam muitas vantagens, quando comparadas aos catalisadores químicos. Dentre elas, pode-se citar: alta especificidade, atuação em ampla faixa de temperatura e pH, alta biodegradabilidade, elevada velocidade de reação, seletividade e eficiência (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Dentre as enzimas utilizadas como biocatalisadores, as lipases (EC 3.1.1.3; triacilglicerol acilhidrolases) têm se destacado, pois podem catalisar reações diversas, como hidrólise, interesterificação, transesterificação, aminólises, entre outras. Estas enzimas são produzidas por plantas, animais e micro-organismos e muito utilizadas industrialmente, sendo sua principal aplicação na produção e detergentes, mas também são aplicadas em indústrias alimentícias, de fármacos, papel, couro, entre outras (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; JAEGER; EGGERT, 2004).

Resíduos agroindustriais são ricos em nutrientes e podem servir para o cultivo de micro-organismos e produção de enzimas (BARBOSA et al., 2011; ANDRADE et al., 2013; ANDRADE et al., 2014). A utilização destes resíduos contribui para a sustentabilidade da produção de lipases, reduzindo os custos, o que favorece a sua aplicação

O fungo utilizado neste trabalho pertence ao gênero *Botryosphaeria* que produz enzimas como lipases, lacases, pectinases, beta-1, 3-glucases, celulasas, xilanases, amilases e inulinases (CUNHA et al., 2003). *Botryosphaeria ribis* EC-01 produziu lipases em óleo de soja (MESSIAS et al., 2009) e foi capaz de produzir altos títulos de lipases sob condição de fermentação submersa quando cultivado em torta de soja (ANDRADE et al., 2013).

Este projeto teve o objetivo de produzir lipases pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 cultivado sob condição de fermentação submersa utilizando resíduos da agroindústria como torta de soja, proveniente de indústria de óleo, melação de cana, proveniente da indústria de cana e bagaço de malte e levedura, provenientes da fabricação de cerveja.

## METODOLOGIA

### MATERIAIS

Os substratos agroindustriais utilizados foram a torta de soja, doada pela IMCOPA (Cambé-PR, Brasil), bagaço de malte e levedura residual proveniente do processo de produção artesanal de cerveja, fornecido pela professora Lilian T. Dusman Tonin, e melação de cana, doado pela Cooperativa Agroindustrial Vale do Ivaí Ltda (Jandaia do Sul – PR). O meio BDA (Batata Dextrose Agar) foi adquirido de Acumedia. O palmitato de *p*-nitrofenila utilizado como substrato para a atividade hidrolítica de lipase foi adquirido de Sigma Aldrich. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

## MICRO-ORGANISMO E CULTIVO

O micro-organismo utilizado foi o *Botryosphaeria ribis* EC-01 mantido em BDA inclinado a  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e repicados trimestralmente. *B. ribis* EC-01 foi transferido do meio de manutenção para placas de Petri contendo meio BDA que foram incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  por 5 dias. Após o crescimento do micro-organismo, quatro esferas (7 mm de diâmetro) contendo hifas homogêneas foram utilizadas para inocular frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido composto por diferentes concentrações de torta de soja (1, 2, 4 e 10 %, m/v), bagaço de malte, levedura e melaço de cana (10, 12 e 14 %, m/v), em água destilada. Os respectivos cultivos permaneceram durante 7 dias em *shaker* a 180 rpm e  $28^{\circ}\text{C}$ . Em tempos determinados, os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 5000 rpm por 15 min. Os extratos livres de células (ELC) obtidos foram armazenados em *ependorffs* a  $4^{\circ}\text{C}$  até determinação da atividade enzimática.

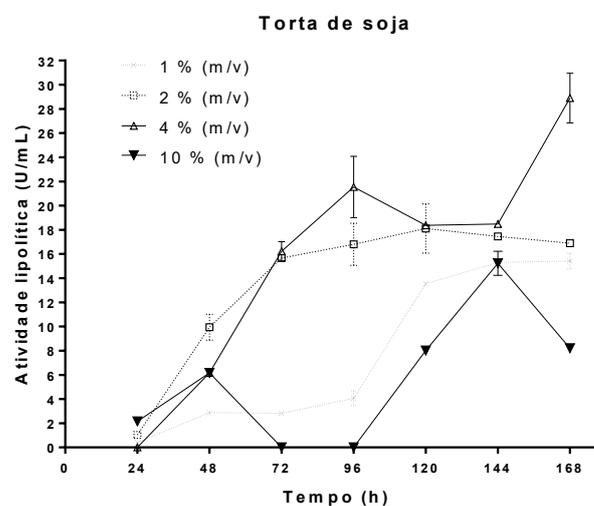
### Determinação da atividade da lipase

A atividade de lipase foi determinada utilizando palmitato de *p*-nitrofenila (pNPP) em meio aquoso, contendo surfactante Triron X-100 (WINKLER, 1979) em pH 8,0,  $55^{\circ}\text{C}$ , 2 min e 410 nm (MESSIAS et al., 2009). A unidade de lipase foi definida como a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de pNP por min, por mL da solução de enzima.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados de atividade enzimática estão expressos em U/mL (atividade volumétrica) em função do tempo de fermentação utilizando o *Botryosphaeria ribis* EC-01. Na Figura 1, pode-se observar os resultados obtidos na produção de lipase por *B. ribis* EC-01 utilizando torta de soja como substrato durante 168 h. Alta atividade enzimática foi encontrada em todas as concentrações testadas, sendo a máxima obtida ( $28,9 \pm 2,05$  U/mL) com a concentração de 4 % (m/v) em 168 h.

Figura 4 – Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 utilizando torta de soja como substrato

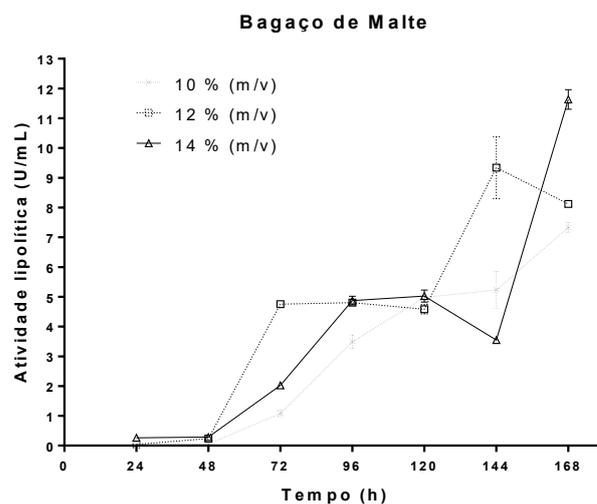


Fonte: Autoria própria (2020)

O uso de resíduos agroindustriais como a torta de soja, proveniente da extração do óleo de soja, pode reduzir o custo de produção de enzimas. Estes substratos são fontes de proteína e carboidratos que servem de nutrientes para cultivar micro-organismos e produzir enzimas. Além disso, são baratos e muito cultivados em países como o Brasil (RAMACHANDRAN et al., 2007; BARBOSA et al., 2011). O uso da torta de soja como substrato para produção de lipases por *B. ribis* EC-01 foi avaliado em estudos anteriores. Em meio otimizado contendo 2,4% (m/v) de torta de soja e 4,5% (v/v) de glicerol durante 120 h, *B. ribis* EC-01 foi capaz de produzir atividade de 76 U/mL. Em outro estudo com o *B. ribis* EC-01, atividade de  $19 \pm 2,0$  U/mL foi obtida em meio contendo 1 % (m/v) de torta de soja em 120 h. A suplementação com 0,01 % (m/v) de ácido glutâmico estimulou a produção de lipase em 60% ( $31 \pm 3,8$  U/mL) (ANDRADE et al., 2014). Neste trabalho 1 % (m/v) de torta de soja alcançou resultado semelhante ( $13,55 \pm 0,01$  U/mL) em 120 h. Tendo em vista que foi utilizado somente torta de soja sem suplementação, os resultados obtidos foram satisfatórios.

A Figura 2 representa a produção de lipase por *B. ribis* EC-01 em meio de cultivo contendo bagaço de malte a 10, 12 e 14 % (m/v) no intervalo de tempo de 24 a 168 h. Observou-se atividade lipolítica neste meio a partir de 48 h, alcançando  $11,6 \pm 0,33$  U/mL com o uso de bagaço de malte a 14 % (m/v) no tempo de 168 h.

Figura 2 – Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 utilizando malte como substrato.



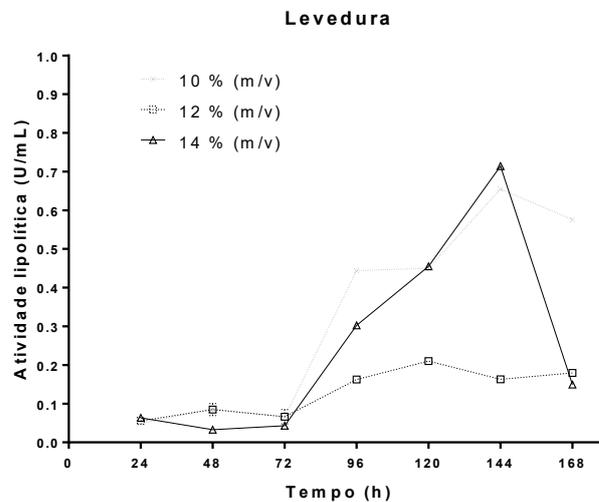
Fonte: Autoria própria (2020)

Entretanto, o meio de cultivo contendo malte a 12 % (m/v), em menor tempo (144 h) obteve bons resultados ( $9,34 \pm 1,04$  U/mL) de atividade lipolítica. Verificase que os resultados obtidos neste trabalho foram promissores desde que somente o bagaço de malte foi utilizado no meio de cultivo, sem nenhuma suplementação, apenas água destilada.

O bagaço de malte é o maior resíduo da indústria cervejeira, totalizando cerca de 85% do total de resíduos produzidos em uma cervejaria. O Brasil é o quarto produtor mundial de cerveja, portanto, possui grande disponibilidade desse subproduto, com baixo custo pela sua aquisição, e apresenta um enorme valor nutricional (ALIYU; BALA, 2011).

Na Figura 3 é representado a atividade de lipase produzida por *B. ribis* EC-01 em meio contendo 10, 12 e 14 % (m/v) de levedura. Nesse meio de cultivo observou-se que a partir de 72 h obteve um crescimento de atividade lipolítica. Entretanto os resultados da atividade não foram satisfatórios, apresentando baixa produção de lipase em todas as concentrações testadas.

Figura 3 – Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 utilizando levedura como substrato.



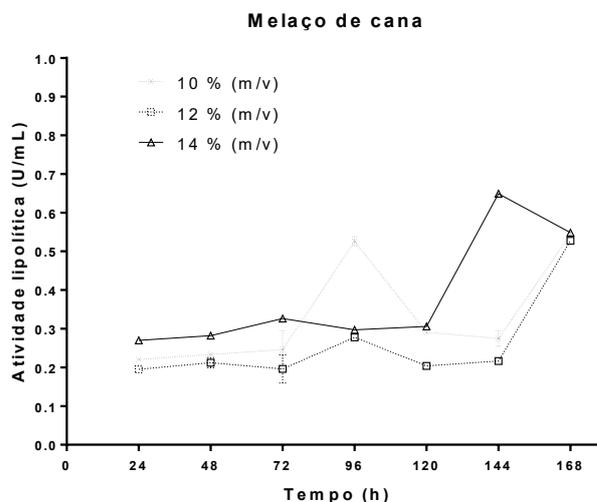
Fonte: Autoria própria (2020)

De acordo com Pacheco (1996) leveduras possuem em suas células aminoácidos, proteínas, lipídios e minerais, sendo assim, era de se esperar boa produção de lipase. Uma possível causa da baixa produção desta enzima utilizando este substrato seria que após o processo fermentativo para a produção de cerveja com a levedura, as células são desativadas por calor. Esta desativação possivelmente contribui para este substrato não apresentar suas características nutricionais anteriores.

Na Figura 4 pode-se observar os resultados de atividade obtidos utilizando o melaço como substrato nas concentrações de 10, 12 e 14 % (m/v) durante 168 h. A atividade obtida neste meio não foi satisfatória, como no meio contendo a levedura, comparado aos estudos anteriores. Este meio se mostrou pobre em nutrientes para que o *B. ribis* EC-01 cresça e produza lipases.

A composição do melaço é variável e depende de vários fatores, os principais componentes do melaço são proteínas, ácidos carboxílicos, vitaminas, aminoácidos e outros (SILVA, 2008), entretanto, estes componentes que são importantes para a nutrição do micro-organismo foram insuficiente nas proporções avaliadas ou até mesmo, o uso isolado deste substrato não favoreceu a produção de lipase por *B. ribis* EC-01.

Figura 4 – Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 utilizando melão como substrato



Fonte: Próprio autor (2020)

Novos experimentos serão considerados a fim de se obter aumento na atividade lipolítica utilizando combinações destes resíduos, assim como a otimização das condições de fermentação.

## CONCLUSÕES

Este trabalho teve o intuito de agregar valor aos resíduos agroindustriais para a produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01. Os resultados indicaram que maior atividade lipolítica foi obtida quando o meio continha 4 % (m/v) de torta de soja ( $28,9 \pm 2,05$  U/mL) em 168 h de cultivo. Novos experimentos serão conduzidos avaliando-se a produção de lipases com combinações destes substratos.

## AGRADECIMENTOS

Pesquisa desenvolvida com o auxílio do LAMAP – Laboratórios Multiusuário de Apoio à Pesquisa do Câmpus Apucarana.

## REFERÊNCIAS

ALIYU; S.; BALA, M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **African Journal of Biotechnology**, vol. 10, n. 3, p. 324-331, Jan., 2011. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/AJB>. Acesso em 02 set. 2020.

ANDRADE, M. M.; BARBOSA, A. M.; BOFINGER, M. R.; DEKKER, R. F. H.; MESSIAS, J. M.; GUEDES, C. L. B.; ZAMINELLI, T.; OLIVEIRA, B. H.; LIMA, V. M. G.; DALL'ANTONIA, L. H. Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on soybean

and castorbean meals: optimization. Immobilization and application for biodiesel production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, p. 1792-1806, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-013-0309-9>. Acesso em: 06 jun. 2020.

ANDRADE, M. M.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; REZENDE, M. I.; MESSIAS, J. M.; DALL'ANTONIA, L. H. Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on Soybean Meal Supplemented with Amino Acids, and Some Physicochemical Properties of the Enzyme. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**. v.16, n.3, p. 169-177, 2014. Disponível em: <http://www.orbital.ufms.br/index.php/Chemistry/article/view/577>. Acesso em: 06 jun. 2020.

BARBOSA, A.M.; MESSIAS, J.M.; ANDRADE, M. M.; DEKKER, R.F.H.; VENKATESAGOWDA, B. Soybean oil and meal as substrates for lipase production by *Botryosphaeria ribis*, and soybean oil to enhance the production of Botryosphaeran by *Botryosphaeria rhodina*. In: **Soybean, Biochemistry, Chemistry and Physiology**. p. 101-118, 2011.

CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 385-392, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12964181/>. Acesso em: 06 jun. 2020.

JAEGER, K.; EGGERT, T. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p.305–313, 2004. Disponível: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166904000862?via%3Dihub>. Acesso em: 30 mai. 2020.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G; DEKKER, R. F. H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A. M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 426-431, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022909001872>. Acesso em 06 jun. 2020.

PACHECO, M. T. B. **Propriedades funcionais, nutricionais e toxicológicas de concentrados proteicos de levedura (*Saccharomyces* sp), obtidos por diferentes processos de extração**. 1996. 158p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/255670>. Acesso em: 16 jun. 2020.

RAMACHANDRAN, S.; SINGH, S. K.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2000-2009, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852406003981>. Acesso em: 03 set. 2020.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975001000866?via%3Dihub>. Acesso em: 30 mai. 2020.

SILVA, C. E. V. **Produção enzimática de frutooliosacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melão de cana-de-açúcar**. 2008. 52p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-10032009-085546/en.php>. Acesso em 16 jun. 2020.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 663-670, 1979. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/222724/>. Acesso em 08 jun. 2020.