

## II-289 – LEVEDURAS PRODUTORAS DE LIPASES ISOLADAS DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE FRIGORÍFICOS

**Sideney Becker Onofre<sup>(1)</sup>**

Biólogo, Mestre em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul (UCS), Doutor em Processos Biotecnológicos pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), Professor Titular do Curso de Engenharia Ambiental da União de Ensino do Sudoeste do Paraná - UNISEP.

**Felippe Constantino<sup>(2)</sup>**

Engenheiro Ambiental graduado pela Faculdade Educacional de Dois Vizinhos (FAED) – União de Ensino do Sudoeste do Paraná - UNISEP.

**Endereço<sup>(1,2)</sup>:** Av. Presidente Kennedy, 2.601 – Bairro N. S. Aparecida – 85660-000 – Dois Vizinhos – Paraná. Fone: (46) 3581-5000 ou (46)9973-9131 - E-mail: becker@unisep.edu.br.

### RESUMO

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e gliceróis, agindo apenas na interface óleo/água, podendo catalisar também reações de esterificação e também catalisam a formação de amidas a partir de ésteres não ativados. Este trabalho, teve como objetivo isolar leveduras potencialmente produtoras de lipases capazes de ser utilizados em sistemas de tratamento de efluentes. As colônias isoladas e purificadas, foram avaliadas visando a obtenção de linhagens/espécies de leveduras produtoras de lipases. Para a realização dessa atividade seguiu-se a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis, determinando-se o índice enzimático (*IE*), pela seguinte relação:  $IE = \frac{\text{diâmetro da colônia} + \text{o halo (DC+h)}}{\text{diâmetro da colônia (DC)}}$ . Os resultados obtidos nos permite concluir que o efluente produzido em frigoríficos, possui uma alta carga microbiana, destacando bactérias com  $6,8 \times 10^8$ , fungos filamentosos com  $3,4 \times 10^4$  e leveduras com  $2,2 \times 10^2$  UFC.ml<sup>-1</sup>. Desta população microbiana, foram isolados seis espécies de leveduras produtoras de lipases, sendo que as espécies de leveduras que se destacaram na produção de lipases foram *Torulopsis* sp. e *Debaryomyces* sp. pois, foram as espécies que apresentaram os maiores índices enzimáticos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Enzimas, Processos, Tratamento de efluentes, Lipases.

### INTRODUÇÃO

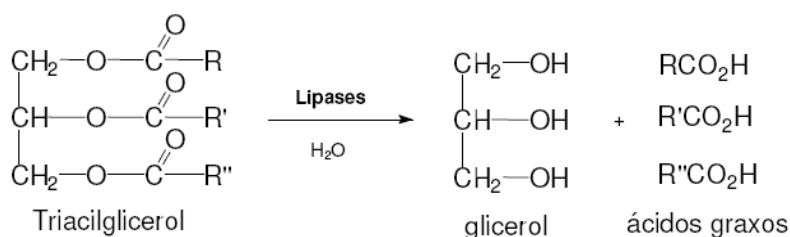
As lipases são enzimas largamente utilizadas no processamento de alimentos, detergentes e síntese de produtos para química fina e fármacos, processamento de óleos e gorduras, manufatura de papel e produção de cosméticos, além de serem utilizadas no tratamento de efluentes gordurosos. Geralmente as lipases industriais são derivadas de fontes fúngicas e bacterianas [1].

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e gliceróis (Figura 1), agindo apenas na interface óleo/água, podendo catalisar também reações de esterificação, transesterificação e interesterificação em solventes orgânicos. As lipases também catalisam a formação de amidas a partir de ésteres não ativados. Estas enzimas podem ser confundidas com as esterases, porém as esterases são enzimas que agem em ésteres solúveis em água ou que hidrolisam outros lipídeos como as acilhidrolases, colesteroesterase e tioesterases [2].

As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), vegetal e microbiana (bactérias e fungos) [3]. Nos animais, estas enzimas participam do metabolismo de lipídeos, como a digestão, a adsorção, a reconstrução de gorduras e também no metabolismo de lipoproteínas. Nas plantas, são encontradas em tecidos de reserva de energia [4].

Industrialmente e economicamente, as lipases microbianas apresentam uma série de vantagens em relação às lipases de origem animal e vegetal. As lipases de microrganismos são em sua maioria extracelulares, apresentando procedimento mais fácil de extração, isolamento e purificação tendo um custo de produção

menor, são mais estáveis e possuem propriedades distintas das lipases de origem animal e vegetal. Bactérias, fungos filamentosos e leveduras são potenciais produtores de lipases [5, 6, 7].



**Figura 1** - Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases.

Os gêneros de leveduras produtoras de lipases são *Candida*, *Cryptococcus*, *Humicola*, *Kurtzmanomyces*, *Ophiostoma*, *Pichia*, *Streptomyces*, *Yarrowia*, entre outros [8]. Assim, este trabalho, objetivou isolar leveduras potencialmente produtoras de lípases capazes de ser utilizados em sistemas de tratamento de efluentes.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o isolamento das leveduras foi utilizado o meio de cultura Sabouraud contendo 1% de peptona; 1% de extrato de levedura, 2% de agar e Tween 80 4%. O pH foi ajustado para 5,5 e autoclavado a 1 atm de pressão, por um tempo de 30 minutos.

Os efluentes coletados nas lagoas, passaram por diluições sucessivas entre  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ . O material de cada tubo foi homogeneizado e inoculado pelo método de pour plate adicionando 1 mL da cada tubo no fundo da placa de Petri. Posteriormente as placas sofreram agitação lenta em forma, mantidas até a solidificação e incubadas invertidas em temperatura de 28° C por 3 dias para a posterior contagem total.

Após o crescimento, colônias isoladas e purificadas foram repicadas em tubos contendo meio sabouraud, inclinado para a manutenção das espécies isoladas, incubadas em temperatura de 28° C. Após o crescimento esse material foi armazenado a uma temperatura de  $\pm -4^\circ$  C para posterior identificação e a avaliação da sua capacidade de produção de lipases.

As colônias de isoladas e purificadas, foram avaliados visando a obtenção de linhagens/espécies de leveduras produtoras de lipases. Para a realização dessa atividade seguiu-se a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis [9], determinando-se o índice enzimático (IE), pela seguinte relação:  $IE = \text{diâmetro da colônia} + \text{o halo (DC+h)} / \text{diâmetro da colônia (DC)}$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a utilização da metodologia descrita foi possível quantificar a flora microbiana dos efluentes coletadas em lagoas de tratamento do frigorífico avaliado. Os resultados estão sumarizados na Tabela 1.

Avaliando a tabela 1, verifica-se que as bactérias são os microrganismos que predominam no efluente, apresentando  $6,8 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, seguidos pelos fungos filamentosos com  $3,4 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> e as leveduras com  $2,2 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Essa diversidade pode ser considerada benéfica nos processos de tratamento desses efluentes, pois uma maior diversidade aumenta a capacidade de biodegradação da matéria orgânica[10].

**Tabela 1.** Contagem total da flora microbiana presente no efluente de frigorífico.

Microrganismo	Contagem em UFC mL <sup>-1</sup>
Bactérias	$6,8 \times 10^8$
Fungos filamentosos	$3,4 \times 10^4$
Leveduras	$2,2 \times 10^2$

Após o isolamento e a identificação, das leveduras essas foram avaliadas quanto a sua capacidade de degradar lipídeos. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 2 e na Figura 1.

**Tabela 2.** Atividade lipolítica das linhagens de leveduras isoladas de efluente de frigorífico.

Microrganismo	(DC)	(DC+h) (mm)	IE*
<i>Torulopsis</i> sp.	17,33	35,12	2,02a <sup>#</sup>
<i>Candida</i> sp.	45,32	67,82	1,49b
<i>Debaryomyces</i> sp.	15,41	32,41	2,10a
<i>Kluyveromyces</i> sp.	22,12	36,78	1,66b
<i>Pichia</i> sp.	18,62	28,29	1,51b
<i>Yarrowia</i> sp.	52,34	71,26	1,36c

\*Índice enzimático obtido da relação diâmetro da colônia / diâmetro da colônia + halo x 100. Média de três repetições. <sup>#</sup>Índices seguidos de mesma letra na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.



**Figura 2.** Halo de degradação provocado pela atividade lipolítica evidenciando a presença de cristais de sais de cálcio do ácido láurico.

Analisando os dados contidos na tabela 2, observa-se que não existe diferenças estatísticas significativas ao nível de 5%, quanto a produção de lipases entre as espécies *Torulopsis* sp. e *Debaryomyces* sp., com índices enzimáticos de 2,02 e 2,10, respectivamente.

Um outro grupo de linhagens que não apresentaram diferenças entre si com relação aos índices enzimáticos, foram as espécies *Candida* sp., *Kluyveromyces* sp. e *Pichia* sp. apresentando índices de 1,49, 1,66 e 1,51, respectivamente. A linhagem que apresentou o menor índice enzimático, e que se diferenciou em relação a outras linhagens foi a espécie *Yarrowia* sp. com um índice enzimático de 1,36. Após a avaliação dos índices obtidos, verificou-se que as leveduras que mais produziram enzimas, foram às espécies *Torulopsis* sp. e *Debaryomyces* sp.

Com os resultados obtidos, pode-se perceber a viabilidade de leveduras em produzir lipases, utilizando como substrato o Tween-80 e os resultados apresentados neste trabalho nos direcionam para que em trabalhos

futuros possamos utilizar as espécies aqui isoladas e em outros métodos fermentativos capazes de avaliarmos a capacidade de cada uma dessas espécies em produzir lipases por métodos quantitativos e cromatográficos.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que o efluente produzido em frigoríficos, possui uma alta carga microbiana, destacando bactérias com  $6,8 \times 10^8$ , fungos filamentosos com  $3,4 \times 10^4$  e leveduras com  $2,2 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Desta população microbiana, foram isolados seis espécies de leveduras produtoras de lipases, sendo que as espécies de leveduras que se destacaram na produção de lipases foram *Torulopsis* sp. e *Debaryomyces* sp. *pois*, foram as espécies que apresentaram os maiores índices enzimáticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DIAZ, J.C.M. et al. Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme Microbial Technol.*, v.39, p.1042-1050, 2006.
2. BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Review.*, v.733, p.1-9, 2002.
3. MARTINS, V.G.; KALIL, S.J.; COSTA, J.A.V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Química Nova*, v. 31, n.8, p.1942-1947, 2008.
4. SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.*, v.19, p. 627-662, 2001.
5. DALLAVECHIA, R. et al. V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v.27, p.623-630, 2004.
6. MENDES, A.A. et al. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Química Nova*, v.28, n.2, p.296-305, 2005.
7. HASAN, F. et al. A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.235-251, 2006.
8. CASTRO, H.F. et al. Modificações de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v.27, n.1, p.146-156, 2004.
9. HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, v.67, p.597-607, 1975.
10. PEREIRA, E. B. Tratamento enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, UFSC, 2004.