



X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Universidade Severino Sombra
Vassouras – RJ – Brasil

INFLUÊNCIA DO pH NA PRODUÇÃO DE LIPASE EM MELAÇO DE SOJA POR *Geotrichum candidum*.

Takarada¹, C. S.; Júnior², W.G.M.; Resende³, M.M.

1 Bolsista do Programa Educacional Tutorial do MEC, discente do curso de Engenharia Química, 2 Bolsista de doutorado da CAPES, discente do curso de Engenharia Química,

3 Professores da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia. Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Campus Santa Mônica, Uberlândia - MG, CEP 38408-100; email: mresende@feq.ufu.br

RESUMO - Atualmente, as lipases constituem o grupo mais importante de enzimas com enorme potencial de aplicação na área biotecnológica, principalmente no processo de transesterificação enzimática para produção de um biodiesel mais puro e com pouca geração de resíduos, porém este é um processo caro devido aos altos custos na produção da lipase. Destacam-se as lipases de origem microbiana, pelas características próprias como a estabilidade a altas temperaturas, ampla faixa de atuação em relação ao pH, além da sua seletividade na resolução de misturas racêmicas. Entretanto, há limitações em sua aplicação industrial, como o custo de obtenção que é determinado pelo rendimento da produção, pelas condições do processo e pela estabilidade da enzima. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo estudar a influência do pH na produção de lipase em meio contendo melaço de soja, por *Geotrichum candidum*, visando aumentar a produtividade do processo, diminuindo custos. Os testes foram realizados num tempo de 24 horas de fermentação submersa com concentração do melaço de soja, no meio, de 200 g/L numa temperatura de 30°C. A atividade de lipase foi determinada por titulação com NaOH 0,05N. A atividade lipolítica máxima alcançada foi de 11,4 U/mL em meio de pH 3.

Palavras chave: fermentação, otimização, produtividade.

INTRODUÇÃO

Lipases pertencem ao grupo das hidrolases que catalisam a conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol. Possuem significativo potencial biotecnológico como catalisadores em reações de síntese orgânica em meio não aquoso utilizando processos simplificados com altos rendimentos. A produção de lipases tem sido realizada, usualmente, por processo fermentativo submerso; entretanto, o processo em fase sólida também tem se mostrado

promissor, quando são utilizados resíduos como fontes de substrato que são nutrientes de baixo custo. As lipases microbianas podem ser utilizadas como aditivos em alimentos para modificar e realçar as propriedades organolépticas, como também em detergentes para hidrolisar gorduras, no tratamento de efluentes oleosos, e ainda, nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos, agroquímicas e oleoquímicas. Recentemente, as lipases têm sido utilizadas em reações de transesterificação para converter óleos em biodiesel.

*Bolsista CNPq. (exemplo)

O melaço de soja é um subproduto gerado pela evaporação do líquido remanescente da secagem da proteína concentrada de soja, com alta concentração de açúcares, nitrogênio, ácidos graxos, aminoácidos e minerais. Pelo subproduto em questão ter um custo baixo e uma composição favorável à produção de lipase torna viável sua utilização nesta pesquisa.

No presente trabalho foi avaliado a influência do pH do melaço de soja na produção de lipase por *Geotrichum candidum*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismos: As fermentações foram realizadas utilizando culturas de *Geotrichum candidum* cedidas pela professora doutora Eliana Setsuko Kamimura da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP-Brasil. O melaço de soja foi obtido pela empresa processadora de soja Selecta, localizada em Araguari/MG- Brasil. Os micro-organismos foram cultivados em meio Sabourand, composto de 10 g/L de peptona bacteriológica, 40 g/L de dextrose e 20 g/L de Agar bacteriológico. Incubados à $34 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas e após este tempo, mantidos a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ em refrigerador.

Fermentação submersa: Duas etapas foram realizadas para o estudo do melaço de soja como meio de produção. Primeiramente, foram realizados testes preliminares para comparar com os resultados obtidos por Ho et al. (2004), onde o meio foi composto de melaço de soja em concentração de 200g/L e pH inicial de 6,15.

Para analisar a influência das variáveis foi realizado um Planejamento Composto Central com 3 réplicas no ponto central. Tais variáveis são, concentração de melaço de soja, pH inicial do meio e temperatura da fermentação.

O melaço foi variado nas concentrações de 100g/L, 150g/L, 200g/L, 250g/L, 300g/L e 350g/L e o pH ajustado com hidróxido de sódio 1N e ácido fosfórico 1N.

A fermentação foi realizada em erlenmeyers de 250 ml com 50 ml de meio, tudo isso em uma incubadora rotativa a 130 rpm e 25°C durante 24hrs.

Planejamento Composto Central: O objetivo foi o estudar o efeito que as variáveis, concentração e pH, influenciavam na produção de lipase, avaliando, enfim, a atividade de lipase. A letra grega utilizada foi o α , sendo os extremos $-\alpha$ e $+\alpha$, e assim respectivamente nas condições, concentração de 100g/L de melaço de soja, pH de 2,5 e temperatura de 25°C e 300g/L de melaço de soja, pH de 3,5 e temperatura de 35°C . O α de rotatividade foi calculado pelo software STATISTICA 7.

Análises físico-químicas: Após a fermentação avaliou-se a atividade de lipase, de protease e o crescimento celular.

A atividade enzimática da lipase foi determinada por titulação com NaOH 0,05N, medindo a concentração de ácidos graxos livres. A reação foi realizada em erlenmeyers de 125 mL com 5 mL de emulsão composta de 25% azeite de oliva e 75% goma arábica (7% p/v) como substrato, 2 mL de tampão fosfato de sódio 0.1M, pH 7 e 1 mL do caldo fermentado centrifugado. Agitou-se a solução por 30 minutos a 45°C com ajuda de um agitador magnético. A reação foi interrompida adicionando-se 10 mL de solução acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados durante a reação foram titulados na presença do indicador fenolftaleína. A atividade foi expressa em unidades de lipase (U), correspondente à 1 μmol de ácido graxo liberado por minuto nas condições especificadas (Tommaso et al., 2010).

Atividade enzimática da protease foi determinada reagindo 0.5 mL de azocaseína 1% e 0.3 mL de caldo fermentado centrifugado. Após 1 hora de incubação a 37°C em um banho termostático, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente. Logo após, adicionou-se 2.4 mL de ácido tricloacético 10% e centrifugou-se a mistura a 3000 rpm por 15 minutos. Adicionou-se 2.4 mL de NaOH 1N em 1.6 mL do sobrenadante resultante, e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 440 nm. A atividade foi expressa em unidade de protease (U), definida como a quantidade de enzima necessária para obter uma diferença de absorbância de 1 U/mL.min de caldo enzimático (Tommaso et al., 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após os testes preliminares foram estabelecidos relações entre os resultados para estabelecer o ponto central, a qual apresentava melhor atividade lipolítica. Na obtenção desses resultados foi construída duas tabelas e proporcionado os resultados da atividade de lipase (U/ml), protease (U/ml.min) e crescimento celular (g/l), assim estabelecido a melhor concentração de melaço em que o *Geotrichum candidum* age, bem como o pH. Abaixo segue a tabela 1, referida no texto.

Tabela 1 – Resultados obtidos variando pH

pH	Atividade de Lipase (U/ml)	Atividade de Protease (U/ml.min)	Crescimento Celular (g/l)
2	0,95	0,377	2,126
2,5	2,05	0,342	3,942
3	11,40	0,317	11,009
3,5	9,60	0,350	12,892
4	7,75	0,365	15,607
4,5	6,40	0,381	12,608
5	5,20	0,327	19,266
6	6,75	0,311	9,515
7	4,75	0,401	11,594
8	4,20	0,405	12,801
9	3,50	0,420	13,013

Através dos dados coletados, com uma forma mais simples e fácil de se observar a atividade de lipase, protease e crescimento celular que o *Geotrichum candidum* foram feitos os gráfico 1, 2 e 3, seguinte abaixo:

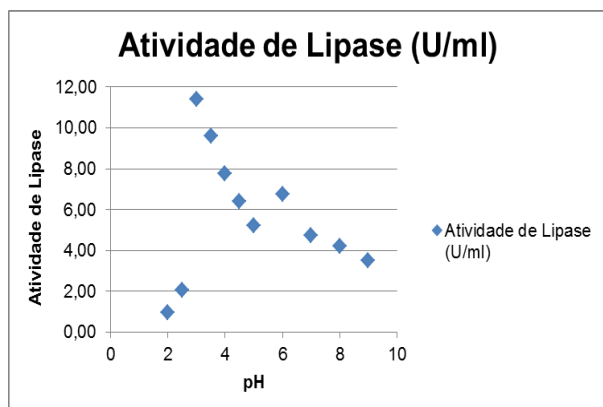


Figura 1 – Gráfico da Atividade de Lipase em relação à variação de pH

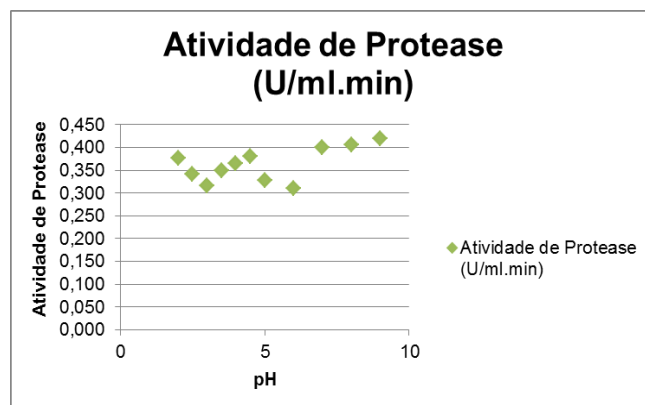


Figura 2 – Gráfico da Atividade de protease em relação à variação de pH

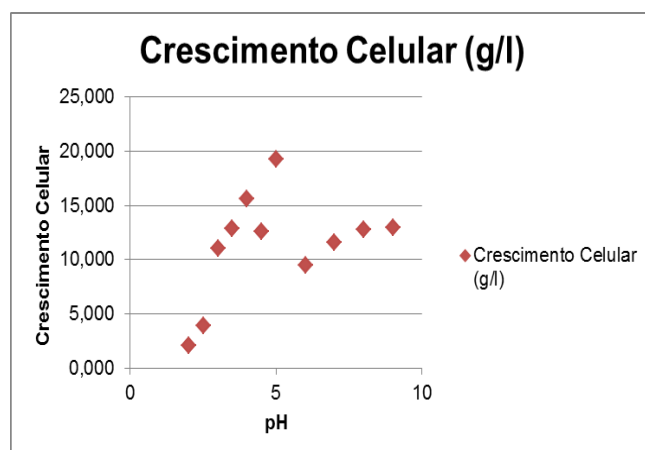


Figura 3 – Gráfico do crescimento celular em relação à variação de pH

CONCLUSÃO

Após a validação do ponto selecionado dentro da região de otimização, conclui-se que para o *Geotrichum candidum*, tem-se uma melhor atividade de lipase na fermentação conduzida com pH inicial de 3.5.

REFERÊNCIAS

- Açikel, Ü.; Ersan, M.; Açikel, Y. S. Optimization of critical medium components using reponse surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. Food and Bioproducts Processing, v. 88, p.31-39, 2010.
- Bussamara, R.; Fuentesfria, A. M.; Oliveira, E. S.; Broetto, L.; Simcikova, M.; Valente, P.; Schrank, A.; Vainstein, M. H.

- Isolation of a lipase secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 268-275, 2010.
- Dalmau, E., Montesinos, J. L., Lotti, M., & Casas, C. - Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 657–663, 2000.
- Del Rio, J. L., Serra, P., Valero, F., Poch, M., & Sula, C. - Reaction scheme of lipase production by *C. rugosa* growing on olive oil. *Biotechnology Letters*, v. 12, p. 835– 839, 1990.
- Ghaly, A.E.; Dave, D.; Brooks, M.S. & Budge, S. - Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, v. 6, p. 54-76, 2010.
- Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A. - Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235- 251, 2006.
- Ho, T.J.M., Barbosa, C.C., Marra Júnior, W.D., Oliveira, C.F.A Kamimura, E.S. - Production of lipase *Candida rugosa* for application in anaerobic treatment of dairy wastewater. *Proceedings of 12º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP (SIICUSP)*, 12 dez São Paulo/Brazil. (CDROM). (in portuguese)
- Kontkanen, H.; Tenkanen, M.; Fagerstrom, R.; Reinikainen, T. - Characterisation of steryl esterase activities in commercial lipase preparations. *J. Biotechnol.*, v. 108, p.51- 59, 2004.
- Kumar, S.; Kikon, K.; Upadhyay, A.; Kanwar, S. S.; Gupta, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*, v. 41, p. 38-44, 2005.
- Li, C.; Cheng, C.; Cheng, T. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween80 as the carbon source. *Biochemical Engineering Journal*, v. 19, p. 25-31, 2004.
- Liu, C.; Chen, C.; Wang, Y.; Chang, J. Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate *Burkholderia* sp. C20. *Biochemical Engineering Journal*, v. 58-59, p. 96-102, 2011.
- Liu, Z.; Chi, Z.; Wang, L.; Li, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pulluans* HN2-3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical Engineering Journal*, v. 40, p. 445-451, 2008.
- Mladenoska, I.; Dimitrovski, A. – Lipase production by *Geotrichum candidum* – M2. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, v. 20, p. 39- 43, 2001.
- Paques, F. W.; Macedo, G. A. Plant lipases from latex: properties and industrial applications. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.
- Pinheiro, T. L. F.; Lipke, N. R.; Kempka, A. P.; Menoncin, S.; Oliveira, D.; Treichel, H.; Luccio, M.; Freire, D. M. G. - Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 31, n. 2, p. 119-125, 2008.
- Rajendran, A., Palanisamy, A., & Thangavelu, V. - Evaluation of medium components by Plackett-Burman statistical design for lipase production by *Candida rugosa* and kinetic modeling. *Chinese Journal of Biotechnology*, v. 34, p. 436–444, 2008.
- Rigo, E.; Ninow, J. L.; Luccio, M. D.; Oliveira, J. V.; Polloni, A. E.; Remonato, D.; Arbter, F.; Vardanega, R.; Oliveira, D.; Treichel, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *LWT – Food Science and Technology*, v. 43, p. 1132-1137, 2010.
- Romão, B. B. Ethanol production from acidic hydrolysed of soybean molasses. Master dissertation, Federal University of Uberlândia, 2011.

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*, v. 58, p. 36-44, 2012.

Salihu, A.; Alam, M. Z.; AbdulKarim, M. I.; Salleh, H. M. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil Mill effluent based médium using statistical experimental design. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 69, p. 66-73, 2011.

Silva, F. B. Ethanol production from enzymatically hydrolysed of soybean molasses. Master dissertation, Federal University of Uberlândia, 2011.

Siqueira, P. F. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. Master Dissertation, Federal University of Paraná/ Universities of Provence and of the Mediterranean, 2007.

Tan, T.; Zhang, M.; Wang, B.; Ying, C.; Deng, L. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 459-465, 2003.

Tommaso, G.; Moraes, B. S.; Macedo, G. C.; Silva, G. S.; Kamimura, E. S. Production of lipase from *Candida rugosa* using cheese whey through experimental design and surface response methodology. *Food Bioprocess Technol*, v. 4, n. 8, p. 1473-1481, 2010.

Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., & Oliveira, J. V. - A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, v. 3, p. 182-196, 2010.

Vargas, G. D. L. P.; Treichel, H.; Oliveira, D.; Beneti, S. C.; Freire, D. M. G.; Luccio, M. - Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, n. 1, p. 47-54, 2007.

Yang, X.; Wang, B.; Cui, F.; Tan, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 6, p. 2095-2103, 2005.

AGRADECIMENTOS

