



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE ACADÊMICA  
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO

MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS  
AMBIENTAIS

**Edson Rodrigues Vieira**

**Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* e potencial  
aplicação em tratamento de soro de queijo**

Recife

2013

**Edson Rodrigues Vieira**

**Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* e potencial aplicação em tratamento de soro de queijo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Alexadra Amorim Salgueiro

Recife

2013

V658p

Vieira, Edson Rodrigues

Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* e potencial aplicação em tratamento de soro de queijo / Edson Rodrigues Vieira ; orientador Alexandra Amorim Salgueiro, 2013  
vi, 57 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2013.

1. Degradação de lipídeos. 2. Resíduos industriais. 3. *Yarrowia lipolytica*. 4. Fermentação submersa. 5. Águas residuais-purificação. 6. Lipase. I. Título.

CDU 574.6

**Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* e potencial  
aplicação em tratamento de soro de queijo**

**Edson Rodrigues Vieira**

Examinadores:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Alexandra Amorim Salgueiro  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP  
Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Aline Elesbão do Nascimento  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Defendida em 27 de maio de 2013

Coordenadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alexandra Amorim Salgueiro

Dedico aos meus pais, Severino Rrodrigues (*in memória*) e Agripina Vieira,  
minha esposa Edvana Rodrigues e filhos, Alisson Uriel e Alane Betriz.

## AGRADECIMENTOS

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Elesbão do Nascimento pela amizade construída e ajuda indispensável na orientação deste trabalho;

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Galba Maria de Campos Takaki pela sua atuante promoção e incentivo a geração do conhecimento científico;

A coordenadora do curso Dr<sup>a</sup> Alexandra Amorim Salqueiro, pelo respeito e sincera acolhida;

A todos os professores do mestrado que com carinho e amizade promovem a aprendizagem;

Aos técnicos do Laboratório Severino Humberto de Almeida e Andre Felipe Santos Lima pela atuação exemplar e disponibilidade;

As Pós Doutorandas Marta Cristina Freitas e Patrícia Mendes de Souza pela simplicidade e atenção com que exercem suas atividades de monitoramento no Laboratório;

A Doutoranda Maria Helena Menezes Estevam Alves e aos mestrandos José Henrique Edmilson Sousa Freitas e Layla Carvalho Mahnke pela ajuda nos experimentos e a disponibilidade de troca de informações;

Aos amigos e colegas, pela força e pela vibração em relação a esta jornada.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo dentro do Projeto – Rede SISBIOTA, a Universidade Católica de Pernambuco e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, pela concessão do espaço para desenvolvimento do Trabalho de pesquisa;

A CNPq e FECEPE, pelo fomento ao desenvolvimento científico.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	i
SUMÁRIO .....	ii
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABELAS .....	iv
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
CAPÍTULO I .....	7
1 INTRODUÇÃO .....	8
2 OBJETIVOS .....	10
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	11
3.1 Enzimas .....	11
3.2 Lipases .....	12
3.3 Micro-organismos .....	15
3.4 Aplicações de lipases microbianas .....	17
3.5 Produção de lipases por fermentação submersa .....	19
3.6 Substrato alternativo .....	23
3.7 Tratamento biológico de efluente lácteo .....	25
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29
CAPÍTULO II .....	35
Degradação de lipídeo de efluente lácteo por bioproduto com atividade lipásica produzido por <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	35
Resumo .....	36
Abstract .....	36
1 Introdução .....	37
2 Material e Método .....	38
3 Resultados e Discussão .....	40
4 Conclusões .....	50
5 Referências .....	51

# LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO I

Figura 1 Reação de entalpia em reação enzimática.....	12
Figura 2 Reações catalisadas por lipases.....	14
Figura 3 Setores produtivos da biotecnologia .....	16

## CAPÍTULO II

Figura 1 Diagrama de Pareto da produção de lipases por <i>Y. lipolytica</i> com 48 h de cultivo submerso, em função das variáveis independentes: resíduo (1), azeite (2), NH <sub>4</sub> Cl (3) e pH (4).....	41
Figura 2 Diagrama de Pareto do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> com quatro repetições no ponto central para formulação do bioproduto de <i>Y. lipolytica</i> .....	45
Figura 3 pH ótimo e temperatura ótima do líquido metabólico formulado com atividade lipásica produzida por <i>Y. lipolytica</i> .....	46
Figura 4 Estabilidades térmicas a pH 5,0 de líquido metabólico formulado com atividade lipásica incubado a 28 e a 50 °C.....	47
Figura 5 Diagrama de Pareto do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> com três repetições no ponto central para tratamento biológico do soro de queijo pelo bioproduto de <i>Y. lipolytica</i> .....	49



# LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO I

Tabela 1 Exemplos de lipases comerciais disponíveis no mercado .....	20
Tabela 2 Produção microbiana de lipases por fermentação submersa .....	23
Tabela 3 Valores de DBO para diferentes tipos de águas residuais.....	26

## CAPÍTULO II

Tabela 1 Atividades lipásicas do líquido metabólico livre de células (U.mL <sup>-1</sup> ) na presença de substâncias estabilizadoras de enzimas durante o armazenamento a 27-30 °C .....	44
Tabela 2 Degradação de óleos e gorduras em soro de queijo pelo bioproduto com atividade lipásica produzida por <i>Y. lipolytica</i> .....	48

## RESUMO

A fisiologia microbiana é uma área promissora da biotecnologia para a síntese de compostos de elevado valor agregado. Os micro-organismos apresentam vantagens devido ao menor período de geração, às facilidades de modificações fisiológicas e genéticas e à grande diversidade de processos metabólicos. O objetivo deste trabalho foi degradar óleos e gorduras de efluente lácteo por lipases produzidas por *Yarrowia lipolytica*. Planejamentos fatoriais foram utilizados para investigar os efeitos de variáveis em três etapas: em fermentação para produção de lipases, em formulação de bioproduto com atividade lipásica para estabilização da ação catalítica da enzima e em tratamento de soro de queijo para degradação de óleos e gorduras. Na presença de resíduo de refinaria de óleo vegetal a 3 % e cloreto de amônio a 0,2 g.L<sup>-1</sup> com 48 h a 28 °C, lipases foram produzidas sob cultivo submerso. O líquido metabólico livre de células com atividade lipásica foi estabilizado com sorbato de sódio a 0,5 %, glicerol a 5 % e RENEX-95 a 10 %. Esse bioproduto apresentou 177 UI.mL<sup>-1</sup> da atividade enzimática durante 30 dias sob armazenamento à temperatura ambiente (27 - 30 °C); pH ótimo 5,0 e 7,0, temperatura ótima de 50 °C e estabilidade térmica durante 120 min com retenção de 100 % da atividade enzimática a 50 °C e pH 5,0. A aplicação de 7 % do bioproduto durante 12 h de tratamento de efluente lácteo degradou 98 % dos óleos e gorduras presentes no soro de queijo. As lipases produzidas por *Y. lipolytica* e formuladas com substâncias estabilizadoras tem potencial para serem aplicadas na degradação de óleos e gorduras.

**Palavras-chave:** lipases, fermentação submersa, resíduo industrial, *Yarrowia lipolytica*, degradação de lipídeos, efluente lácteo.

## ABSTRACT

The microbial physiology is a promising area of biotechnology for the synthesis of compounds of high value. The micro-organisms have advantages because of their shorter generation facilities to physiological and genetic changes and the wide variety of metabolic processes. The aim of this study was to degrade oils and fats from lipases produced by *Yarrowia lipolytica*. Factorial designs were used to investigate the effects of variables in three stages: fermentation for lipase production, bioproduct formulation for stabilization the catalytic action of lipases and treatment of whey for degradation of fats and oils. In the presence of a vegetable oil residue at 3 % and ammonium chloride at 0,2 g.L<sup>-1</sup>, during 48 h at 28 °C, lipases were produced under submerged cultivation. The cell-free liquid metabolic was stability with sodium sorbate at 0.5 %, glycerol at 5 %, RENEX-95 at 10 %. This bioproduct presented 177 UI.mL<sup>-1</sup> of the lipase activity during 30 days of storage at room temperature (27 - 30 °C); it showed optimum pH at 5.0 and 7.0, optimum temperature of 50 °C and thermal stability for 120 min with retention of 100 % of the enzyme activity at 50 °C and pH 5,0. The application of the bioproduct at 7 % during 12 h degraded 98 % of oils and fats present in cheese whey. The lipases produced by *Y. lipolytica* and formulated with stability agents have potential to be applied in the degradation of oils and fats.

**Keywords:** lipases, submerged cultivation, agro-industrial waste, *Yarrowia lipolytica*, lipid degradation, dairy effluent.

# **CAPÍTULO I**

# 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sustentável tem sido incentivado pela utilização de meios e fontes de energia renováveis. As vantagens desse desenvolvimento ocorrem no campo econômico com produção de insumos a partir de fontes renováveis naturais e no campo tecnológico, em cujos processos os resíduos são reaproveitados ou biodegradados (FARIAS et al., 2008).

Nesse contexto, a utilização de resíduos ou subprodutos na composição de meio de cultivo para produção de enzimas microbianas tem sido investigada. Existem enzimas produzidas por diferentes micro-organismos que requerem destaque especial devido ao valor econômico (SCHENBERG, 2010; SILVA et al., 2009). Entre essas, encontram-se as lipases que apresentam ampla diversidade bioquímica, favorecendo dessa maneira as aplicações biotecnológicas (NAVARRO et al., 2011; ERNANDES et al., 2010).

Animais, plantas, protozoários, fungos filamentosos, leveduras, bactérias e vírus produzem lipases cujas propriedades variam de acordo com sua origem (ILLANES, 2008). A impossibilidade das lipases de animais e plantas atenderem à demanda mundial de enzimas tem ocasionado interesse cada vez maior pelas de origem microbiana (FERNANDES et al., 2010). Os micro-organismos representam uma excelente fonte dessas enzimas devido a sua diversidade biológica, menor tempo de geração e facilidades de manipulações genética e fisiológica. Diferentes enzimas lipolíticas são produzidas por organismos distintos ou por uma mesma cepa em função das condições de cultivo (BROOKS, ASAMUDO, 2011).

Segundo Freire e Castilho (2008), as lipases têm lugar de destaque no mercado mundial de enzimas por constituir um dos grandes grupos em volume de mercado (importação), movimentando bilhões de dólares e pelo aumento da quantidade de informações reportadas na literatura (BON et al., 2008). Esses biocatalizadores são aplicados em várias áreas industriais: alimentícias (aditivo na modificação de aromas), química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), couro (remoção de lipídeos da pele dos animais), farmacêutica e médica (remédios, digestivos e enzimas para diagnóstico). No entanto, o elevado custo de produção limita as aplicações (KAUSHIK et al., 2011; RAJAN, NAIR, 2011).

A crescente demanda por leite e produtos lácteos ocasionou um acréscimo no número de indústrias de laticínios e conseqüentemente, um aumento na quantidade de águas residuárias descartadas. Estima-se que 90% dessas empresas em funcionamento são de pequeno e médio portes que não estão adequadas às novas tecnologias limpas, lançando seus efluentes de carga orgânica poluente em cursos d'água (MENDES, CASTRO, 2004; LOPORENA et al., 2009). Os efluentes lácteos são caracterizados pela

elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) - 30.000 a 40.000 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) cujo valor é aproximadamente 100 vezes maior que de um esgoto doméstico. O efluente lácteo é um poluente por conter: substâncias gordurosas, lactoses, proteínas, sais. Por outro lado, é considerado um produto nobre pelo seu teor de proteínas solúveis, ricos em aminoácidos essenciais, pela presença de vitamina do grupo B e pelo elevado teor de lactose e sais (BAROSA et al., 2010; MARMIROLI, 2012).

Elevadas concentrações de óleos e gorduras, presentes em efluentes de indústrias de laticínios, reduzem a eficiência nos tratamentos convencionais. Nos tratamentos aeróbios, como o sistema de lodo ativado, a elevada concentração de óleos e gorduras causam a formação de filmes em torno dos flocos biológicos, impedindo a transferência de oxigênio para o micro-organismo com proliferação de micro-organismos filamentosos que formam flocos soltos flutuantes no tanque de sedimentação. No caso de digestão anaeróbia, quantidades excessivas de óleos e gorduras inibem a ação de bactérias actogênicas e metanogênicas (LOPORENA et al., 2009; MENDES, PEREIRA, CASTRO, 2010 ).

Efluentes oleosos podem ser pré-tratados por meio de enzimas, em especial as lipases que atuam na interface orgânica-aquosa e catalisam a hidrólise de ligações éster-carboxílicas presentes em acilglicerois (BON et al., 2008; CASTRO, MENDES, 2005; SOUZA, 2011; BASHEER et al., 2011).

Considerando, o déficit econômico com a importação de enzimas (lipases), a versatilidade dos micro-organismos na produção de enzimas e o potencial do Brasil em resíduos agroindustriais, além da poluição ambiental causada pelos efluentes lácteos, esse trabalho visa à produção de lipases microbianas por reaproveitamento de resíduo para aplicação na degradação de óleos e gorduras de soro de queijo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Produzir lipases por *Yarrowia lipolytica* na presença de resíduo da refinaria de óleo vegetal para aplicação em tratamento de efluente lácteo.

### 2.2 Objetivos específicos

- produzir lipases na presença de resíduo da refinaria de óleo vegetal;
- avaliar os efeitos de pH e temperatura na atividade lipolítica;
- investigar a estabilidade do líquido metabólico formulado com atividade lipolítica durante o armazenamento para aplicação industrial;
- degradar óleos e gorduras por tratamento biológico de soro de queijo por ação de lipases;
- analisar estatisticamente os resultados obtidos.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Enzimas

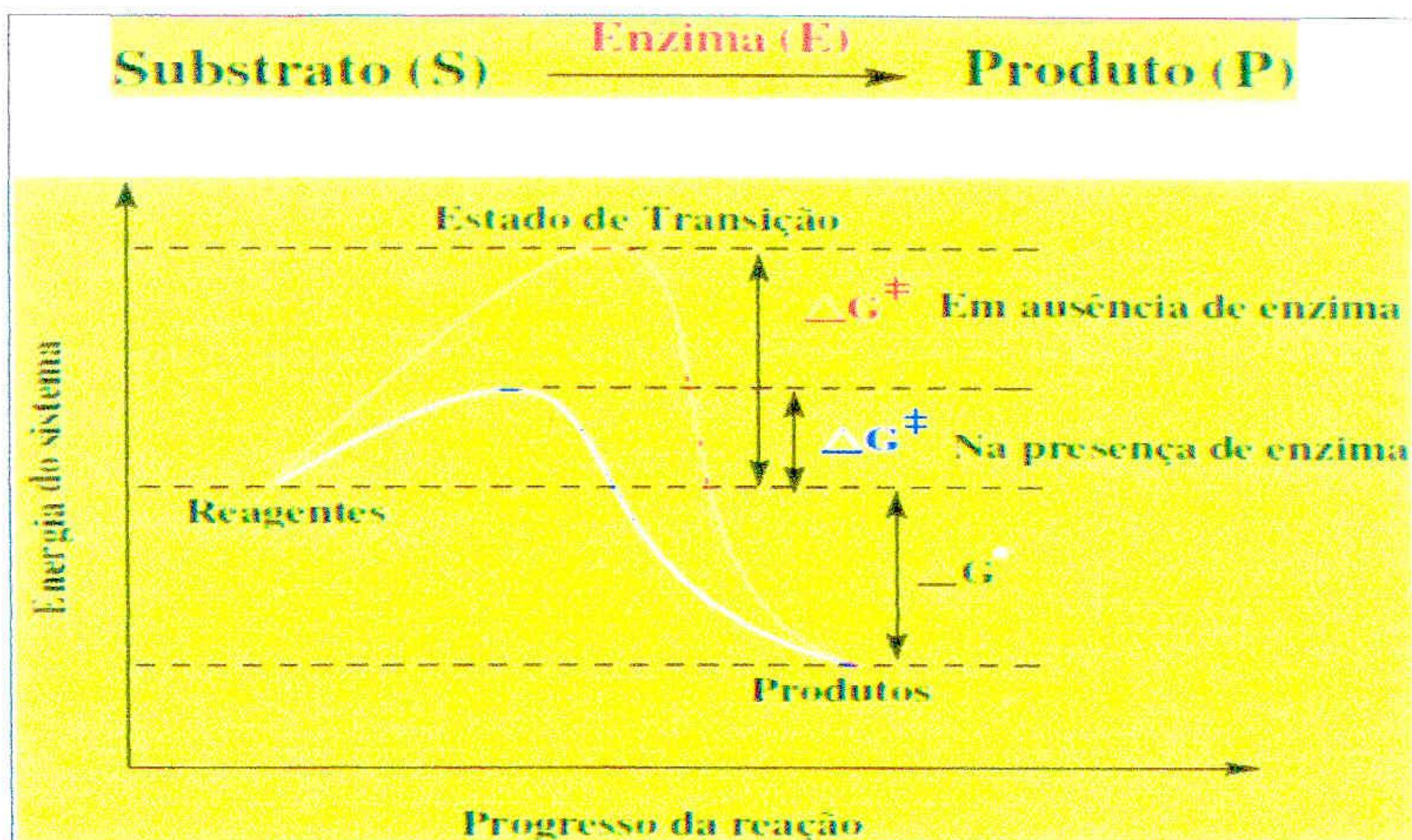
As enzimas são proteínas de complexidade estrutural presente em todos os seres vivos; atuam como catalisadores na maioria das reações químicas do metabolismo celular, acelerando a velocidade das reações químicas em sistemas biológicos. A figura 1 ilustra a reação de entalpia das enzimas (NELSON, COX, 2006). Devido às condições amenas de temperatura e pH em que essas macromoléculas atuam, nos processos industriais de catalisadores químicos por enzimas, aumentam os benefícios econômicos, como por exemplo redução de tempo e energia. Devido às características das enzimas esses catalisadores podem ser utilizados industrialmente por reaproveitamento de resíduos industriais para a produção de metabólitos de valor econômico diminuindo o impacto desses resíduos no meio ambiente (DHILLON et al., 2012).

Três propriedades distintas das enzimas permitem que exerçam papel central na promoção e regulação dos processos celulares, caracterizando-as como componentes vitais aos sistemas vivos: elevada especificidade da reação (enzimas específicas para cada reação), condições reacionais mais brandas (temperatura e pH), capacidade de regulação da concentração e da atividade (diferentes metabolismos em função das condições fisiológicas) (BAPTISTA et al., 2012).

Esses biocatalizadores apresentam um papel muito importante em vários setores industriais, devido ao avanço da tecnologia, como também da ciência das proteínas, principalmente na área de bioquímica onde passaram a ser extraídos de células produtoras e identificados como proteínas dotadas de ação catalítica (ERNANDES et al., 2010). São aplicadas em estudos de biologia molecular, desenvolvimento de metodologias analíticas, fabricação de produtos tecnológicos, no tratamento de efluentes, dentre outros (SILVA et al., 2009, BAPTISTA et al., 2012).

As enzimas têm capacidade de agir sobre sangue, gordura, muco, saliva, proteínas em geral, produzindo compostos mais fáceis de serem removidos e, por conseguinte, torna mais efetiva a ação de agentes de limpeza. A indústria de produção de limpeza absorve mais de 40 % da produção mundial de enzimas, dentre elas, estão às proteases e as lipases (BARATTO, 2011).





Fonte: Nelson, Cox (2006)

Figura 1 Reação de entalpia em reação enzimática

### 3.2 Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3 triacilglicerol acilhidrolases) são enzimas pertencentes à família da hidrolases, atuando na interfase orgânica-aquosa demonstrando níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes aquosos e não-aquosos, ao contrário de outras enzimas. Dependendo da fonte, as lípases podem ter massa molecular variando de 20 a 75 kDa, atividade em pH entre 4,0 a 9,0 em temperaturas variando de 28°C a 70°C. Apresentam em sua maioria uma atividade ótima na faixa entre 30°C e 40°C, sendo sua termoestabilidade variando consideravelmente em função da origem. (MARTINS et al., 2008; TALIRASAN, KUMAR, 2011; UNIPROT, 2013). Estão entre as mais importantes classes de enzimas, sendo destacadas no cenário biotecnológico pela sua versatilidade, e aplicadas em vários setores biotecnológicos, indústrias alimentícia, farmacêutica, além da produção de biodiesel, detergentes e cosméticos (BON et al., 2008; JIN-LAN et al., 2011; NAQVI et al., 2011; SALIHU et al., 2011).

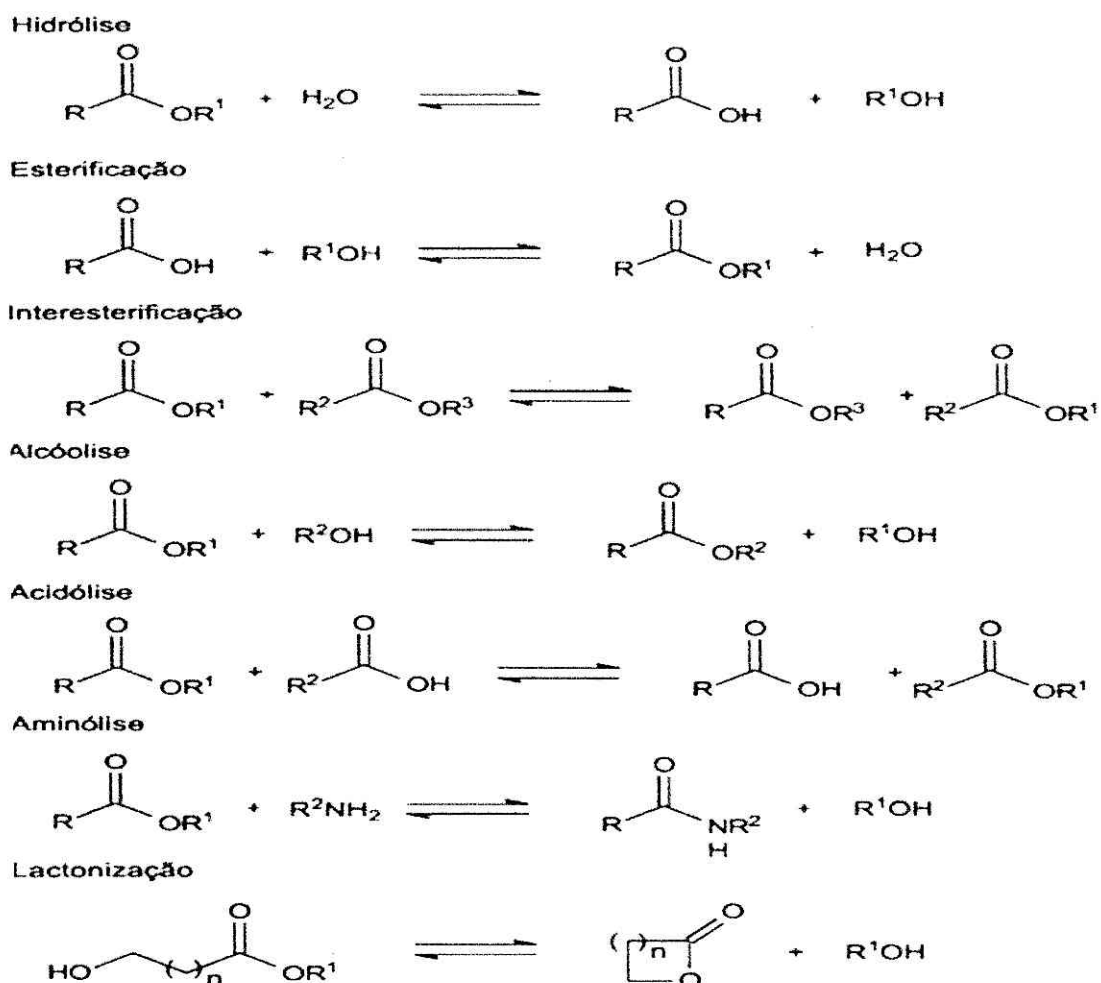
A utilização de lípases apresenta várias vantagens: estabilidades a elevadas temperaturas e ampla faixa de pH, facilidade de separação dos produtos e, quando imobilizadas, podem apresentar elevada estabilidade térmica por longo período de tempo e serem aplicadas em processos contínuos, vantagens essas, que as tornam de grande importância no mercado mundial de enzimas. Estudos apontam que esses biocatalizadores

terão importância industrial confrontável as pectinases que representam cerca de 30 a 40 % das vendas de enzimas industriais (BON et al., 2008; DARVISHI et al., 2009; NWUCHE, OGBONNA, 2011; GODOY et al., 2010).

A figura 2 ilustra a capacidade das lipases em catalisar não apenas a hidrólise de triacilglicerídeos, mas também, reações de síntese reversa como: esterificação, transesterificação e interesterificação, permitindo a sua utilização na síntese regioseletiva ou na resolução estereosseletiva de alcoóis, ácidos carboxílicos e aminas. Essa capacidade das lipases em catalisar essas reações com elevada eficiência e estabilidade, as tornam muito atrativas e versáteis. (KAUSHIK et al., 2011; KUMAR et al., 2012; BRUSHAN, YADAV, PARSHAD, 2011).

As pesquisas realizadas com lipases estão centradas em aumentar o grau de conhecimento das características estrutural e do mecanismo de ação dessas enzimas, assim também como criando modelos que possam explicar e prever a sua enantiosseletividade, como na clonagem e expressões de genes de lipase de características interessantes em organismos de fácil cultivo, em larga escala (TREICHEL et al., 2010).

Foi descoberto em estudos de cristalografia que a maioria das lipases possui um sítio recoberto, e que o estado inativo pode prevalecer em solução, com essa descoberta postulo-se que as lipases possuem uma “tampa” hidrofóbica, formada por um oligopeptídeo helicóide, que protege o sítio ativo. Ao interagir com uma superfície hidrofóbica, ocorre a ativação interfacial, na qual o sítio ativo é exposto, permitindo livre acesso ao substrato. No entanto nem a presença da “tampa”, nem a ativação interfacial, são características genéricas de todas as lipases. Como exemplo pode citar as lipases de *Candida rugosa*, que ao ser cristalizado em duas diferentes condições, mostrou-se o sítio recoberto e o sítio exposto (CASTRO et al., 2004).



Fonte: Parques e Macedo (2006)  
 Figura 2 Reações catalisadas por lipases

As lipases podem ser de origem animal, vegetal e microbiana, tendo suas propriedades variáveis de acordo com a sua procedência. Nos animais essas enzimas participam do metabolismo de lipídeos como a digestão, a adsorção, a reconstituição de gorduras e também no metabolismo de lipoproteínas. Nas plantas são encontradas em tecidos de reservas de energia (MENONCIN et al., 2008)

As lipases foram obtidas inicialmente de pâncreas de animais descoberta feita por Claude Bernard (1856); Verificando que essa enzima solubilizava gotas de óleo, se tornando importantíssima no pré-tratamento de efluente rico em gorduras animais, por se mostrarem eficientes na hidrólise de triacilgliceróis contendo ácidos graxos com mais de 12 átomos de carbono. Anos mais tarde, o acesso ao material de origem animal foi se tornando de difícil acesso, onde surgiu o interesse pelas lipases microbianas que assumiram lugar de

destaque no mercado mundial das enzimas, evidenciadas pelas aplicações em vários setores industriais (BROOKS, ASAMUDO, 2011).

As lipases apresentam nos micro-organismos atividades fosfolipídicas, que são utilizadas como mecanismo de defesa, ao serem secretadas proporciona competição com a microflora; facilita a digestão dos lipídeos e os ácidos graxos livres liberados auxiliam na adesão tecidual célula-célula e célula-hospedeiro (CASTRO et al., 2004; BEOPOULOS et al., 2009).

As enzimas microbianas apresentam uma grande estabilidade quando comparadas as extraídas de plantas e animais, se destacando no cenário biotecnológico por apresentarem elevada velocidade de síntese, facilidade de manipulação fisiológica e genética de sua capacidade produtiva, o que torna sua produção mais vantajosa e segura. (WANG et al., 2011). Sendo a maioria das lipases microbianas extracelular, a composição do meio influencia na sua produção, assim também como fatores físico-químicos pH, temperatura e oxigênio (TREICHEL et al., 2009).

Essas enzimas apresentam um elevado potencial biotecnológico na produção industrial e a otimização dos substratos é de grande importância para redução de custos na produção, estima-se que aproximadamente 30-40% do custo envolvido na produção desses biocatalizadores é devido ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos micro-organismos (GODOY et al., 2010; DEIVE et al., 2011).

### **3.3 Micro-organismos**

A diversidade microbiana representa uma fonte importante de recursos genéticos para o avanço da biologia e biotecnologia. Estudos realizados em ecologia molecular microbiana mostram a ampla extensão da diversidade microbiana na natureza. Isolamento e seleção de micro-organismo têm garantido o desenvolvimento de novos fármacos e aplicações nas áreas de saúde, agricultura, indústria e meio ambiente. Com as novas tecnologias envolvendo bioinformática e biologia molecular, é possível a caracterização e descobertas de novos genes, enzimas, metabólitos, bioativos e fármacos, a partir da clonagem direta de DNA de amostra ambientais, com isso, novas estratégias de seleção e triagem de novos produtos tem sido realizado a partir do conhecimento da genômica e expressão gênica de organismos diversos (MESSIAS et al., 2013).

Diferentes micro-organismos são utilizados para produção de substâncias de interesse comercial por processo fermentativo: antibióticos, ácidos orgânicos, solventes, enzimas e biocombustíveis (IMANI, KARAMAN, CARAPATI, 2010). O produto pode ser ainda o próprio micro-organismo, a produção de levedura de panificação e inoculantes

agrícolas, ou células microbianas podem ser utilizadas em processos de biotransformação, a produção de esteróides, aromas e fragrâncias (NAJJAR et al., 2011). Além da produção de bens de consumo, os micro-organismos são também utilizados em processos de tratamento de resíduos e efluentes urbanos e industriais, na recuperação de metais, tais como cobre, chumbo e urânio, ou em processos de biorremediação de solos contaminados (ALBERTON et al., 2011).

A biotecnologia é uma área interdisciplinar que envolve diversos setores produtivos (figura 3). Em decorrência das várias aplicações de seus produtos, a biotecnologia insere-se em uma gama de segmentos industriais, os principais produtos biotecnológicos podem ser agrupados de acordo com o seu uso, na indústria farmacêutica (antibióticos, hormônios, vacinas, vitaminas e proteínas terapêuticas humanas), alimentícia (aminoácidos, flavorizantes, polissacarídeos e gomas xantana) e na indústria química (etanol, acetona, butanol, glicerol, ácido láctico, ácido cítrico, poliésteres, inseticidas microbianos) (PEREIRA, 2008; KUMAN, et al., 2012).

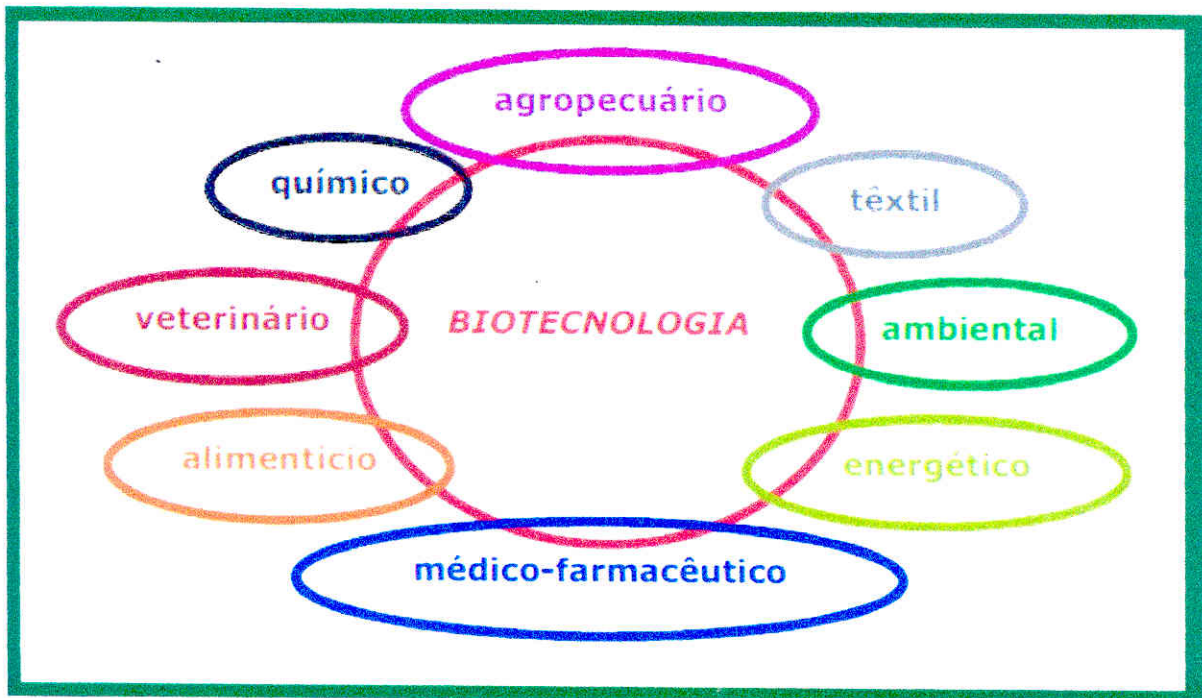


Figura 3 Setores produtivos da biotecnologia

Fonte: Pereira (2008)

Na natureza, grande parte da atividade necessária para o aproveitamento da matéria orgânica é realizada por fungos e bactérias produtores de enzimas. Tais micro-organismos representam excelente fonte de enzimas devido à facilidade de manipulação genética e à ampla diversidade bioquímica. Nesse contexto, as lipases de origem microbiana são

preferidas em relação às de origem animal e vegetal por expressarem características desejadas para aplicação biotecnológica (NWUCHE, OGBONNA, 2011).

As leveduras têm destaque como fonte de biocompostos, entre os quais predominam as proteínas. São micro-organismos aplicados em indústrias de alimentos porque a maioria das espécies não apresenta características patogênicas. Dentre as leveduras, a *Y. lipolytica* se destaca por ser uma espécie amplamente utilizada em aplicações industriais devido a sua versatilidade em produzir metabólitos de valor econômico, pertence ao grupo das leveduras não-convencionais que não apresentam patogenicidade (YUZBASHEVA et al., 2012).

Em processos considerados seguros pela "Food and Drug Administration", foi utilizada em aplicações tecnológicas, na produção de proteína (biomassa) e ácido cítrico (YUSBASHEVA et al., 2011). Essa levedura utiliza substratos hidrofóbicos tais como: alcanos, ácidos graxos e óleos para o seu crescimento e secreta as proteínas: proteases, RNase e lipases com elevada produtividade (BEOPOULOS et al., 2009).

Substratos e formas de fermentação vêm sendo cada vez mais estudados com o objetivo da redução de custos na produção de lipases microbianas, tornando essa enzima viável economicamente (SATIS-NAVARRO et al., 2011)

### **3.4 Aplicações de lipases microbianas**

A capacidade das lipases em catalisar a hidrólise de éster, atuar em meios não-aquosos, reações de esterificação, interesterificação e transesterificação, permite que essas enzimas sejam usadas em síntese regiosseletiva ou na resolução estereosseletivas de alcoóis, ácidos carboxílicos e aminas, originando produtos ativos (ésteres ou amidas), ampliando consideravelmente as possibilidades de aplicações dessas enzimas. Por esse motivo as lipases tornam-se excelentes alternativas em vários setores industriais, como na indústria de alimentos, de detergentes, oleoquímica, farmacêutica, de química fina, de cosméticos e fragrâncias, de polpa e papel, de couro, de biossensores e no tratamento de efluentes ricos em óleos e graxas (BON et al., 2008).

As lipases são empregadas com obtenção de ácidos graxos livres, a partir da hidrólise seletiva de óleos e gorduras presentes em determinados alimentos. Na indústria de panificação, são utilizadas para a produção da massa macia. Na fabricação de queijo, são empregadas na alteração e intensificação do sabor, como também em processos de aceleração e maturação. Ainda na indústria de laticínio, as lipases são empregadas na obtenção de margarinas de baixo teor calórico (PEREIRA, 2008; BROOKS, ASAMUDO, 2011).

As lipases, por apresentarem seletividade régio e estereoquímica, são muito utilizadas na indústria oleoquímica e na química fina; o seu uso nos processamentos de óleos tanto economiza energia, como também minimiza a degradação durante a alcoólise, acidólise, hidrólise e glicerólise (DEIVE et al., 2011). Além da capacidade de modificação de triglicerídeos por interesterificação, as lípases podem produzir lipídeos estruturados, que podem ser uma alternativa importante para a substituição de óleos vegetais no mercado (KAUSHIK et al., 2011).

Na indústria têxtil, a utilização de extrato bruto de enzimas, ou parcialmente purificado, fornece inúmeras vantagens, por diminuir o emprego de álcalis e de outros agentes químicos, além de evitar lavagem excessiva dos produtos, reduzindo o consumo de água e energia. As enzimas atuam na remoção de amido, pectina, óleos e outros resíduos presentes nos tecidos. O tratamento enzimático não modifica a estrutura celulósica do tecido, mantendo a sua resistência mecânica, e ainda proporcionando um grau de brancura comparável com a preparação alcalina do algodão, dispensando etapas de branqueamento. A remoção de substâncias pécticas, utilizando métodos convencionais é dificultada pela associação dessas moléculas com cátions (BON et al., 2008; ANDREWS, CAVACO-PAULO, 2008; BARATTO, 2011; BAPTISTA, 2012).

Quanto à indústria de papel, o auxílio das lipases garante a remoção do alcatrão, constituído em grande parte por ceras e triglicerídeos, deixando o produto com elevada qualidade. Quando utilizadas junto com celulases e ligninases, essas enzimas podem eliminar os depósitos de resinas nos cilindros de secagem, que nesse caso diminui a frequência de limpeza dos mesmos (MATEUS et al., 2012).

Quando comparado com outros surfactantes, os detergentes que contêm enzimas se destacam pela sua grande qualidade em remoção das manchas, em superfícies e tecidos, como também pela menor temperatura necessária à lavagem e por serem biodegradada. O emprego das lípases em formulação de detergentes, é devido à estabilidade dessas enzimas nas condições de lavagem, entre pH 10 e 11 e em temperaturas de 30 a 60 °C, com a capacidade de atuarem sobre diversos óleos (BROOKS, ASAMUDO, 2011; YUZBASHEVA et al., 2012).

No tratamento um de efluentes de diversas origens, trata-se de uma área crescente de atuação de lípases. A literatura reporta vários trabalhos realizados com lípases no tratamento de vários efluentes com resultados satisfatórios.

Alberton e colaboradores (2010) utilizaram lípases produzidas por *Rhizopus microsporus* em pré-tratamento de efluentes lácteos, com nível de lipídeos acima de 1300 mg.L<sup>-1</sup> e reduziram o nível de óleos e gorduras para um valor inferior a 300 mg.L<sup>-1</sup> após 72 h de tratamento enzimático a uma temperatura de 35 °C.

Realizando estudos para remoção de gordura em efluente lácteo por ação de lipases, Loperena e colaboradores (2009) chegaram a uma redução de 75 % de gordura do efluente após 24 horas da ação da enzima em temperatura de 30 °C.

Mendes e Castro (2004) utilizaram lipase pancreática para hidrólise de óleos e gorduras presentes em soro de queijo. No final do tratamento enzimático obtiveram concentrações de ácidos graxos próximos a zero. Em relação à DQO o resultado foi pouco significativo com o tratamento enzimático devido à alta concentração de lipídeos. Pois os mesmos afirmam que elevadas concentrações de lipídeos (0,8 a 1,2 g.L<sup>-1</sup>) diminui na eficiência da remoção de DQO.

Um dos grandes avanços da biotecnologia, foi o emprego das lipases na produção de biodiesel; após a transesterificação de triglicerídeos de cadeia curta, são produzidos ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, os quais podem ser empregados como combustível, com a grande vantagem de não produzir particulados nem dióxido de enxofre (ZHANG, HU, 2012).

### **3.5 Produção de lipases por fermentação submersa**

Diversas lipases estão atualmente sendo produzidas em larga escala e aplicadas em vários setores comerciais, o que necessariamente quando utilizadas industrialmente passam pela redução de custos de produção, que pode ser alcançado por seleção de novos micro-organismos produtores, como o melhoramento genético, modificações do meio de cultura e otimização das condições de cultivo, além do sistema de produção (ZHANG, HU, 2012). A redução no custo do substrato também seria uma estratégia adequada para aumentar a produtividade desses biocatalisadores, já que o maior custo de produção está envolvido com o meio de produção (DHILLON et al., 2012).

A literatura cita mais de 4.000 enzimas conhecidas mundialmente, das quais apenas 200 delas são comercializadas, cerca das 75 % das enzimas industrializadas são hidrolases e 90 % são de origem microbiana produzidas por processos fermentativos, estando as lipases ocupando o terceiro grande grupo em volume de vendas no mundo, movimentando bilhões de dólares. Mesmo com a grande variedade de lipases microbianas, Os elevado custos de produção faz com que essa enzima se torne insuficiente em escala industrial. A tabela 1 apresenta alguns exemplos de lipases comerciais disponíveis no mercado (BON et al., 2008).

Métodos fáceis que sejam capazes de reduzir custos na produção microbiana de lipases devem ser estudados e assim atender o aumento da demanda da exploração comercial. Vários parâmetros podem influenciar na produção dessas enzimas, composição do meio (fonte de carbono, nitrogênio, presença de indutores, pH), todos se mostram de



grande importância para otimização da produção (RIGO et al., 2010; ALBERTON et al., 2011; MENONCIN et al., 2010; KRANTHI et al., 2012).

Dois tipos de fermentação são reportados na literatura como processos de produção de lipases microbiana: fermentação sólida (FS) e fermentação submersa (FSM) levando em consideração, a seleção do micro-organismo, escolha do substrato, otimização dos parâmetros do processo, isolamento e purificação do produto; a FS é um processo interessante do ponto de vista econômico em relação o baixo custo das matérias-primas, no entanto, dificuldades como controle e monitoramento do processo e a baixa oxigenação dificulta a produção de substâncias de interesse comercial em grande escala (SILVA, 2010). A FSM é o processo mais utilizado para a produção de lipases, cuja característica principal é a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis. Na produção em larga escala esse tipo de fermentação apresenta uma elevada vantagem em relação à FS pela sua facilidade no controle dos parâmetros do processo (SILVA, 2010; MARTINS et al., 2011; YU et al., 2012).

Tabela 1 Exemplos de lipases comerciais disponíveis no mercado

<b>Organismo produtor</b>	<b>Aplicação industrial</b>
<i>Candida rugosa</i>	Síntese orgânica
<i>Candida artactica A/B</i>	Síntese orgânica
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Aditivos para detergentes
<i>Rhizomucor miehei</i>	Processamento de alimentos
<i>Burkholderia cepacia</i>	Síntese orgânica
<i>Pseudomas alcaligenes</i>	Aditivo para detergente
<i>Pseudomas mendocina</i>	Aditivo para detergente
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Síntese orgânica

Fonte: Bon et al. (2008)

Fatores como aeração e agitação são de fundamental importância na produção de lipase, micro-organismos estritamente aeróbio quando utilizados para a produção de lipases como é o caso da levedura *Y. lipolytica* utilizam o oxigênio presente no meio, que funciona comoceptor final de elétrons, reoxidando moléculas na cadeia respiratória (HOLZ et al., 2009).

Trabalhos realizados por Kebabci e Cihang, (2012) mostram que a agitação pode ser importante na produção de lipases por *Y. lipolytica*, eles investigaram a agitação de 100 – 250 rpm e constataram que o aumento da agitação levou a obtenção de maiores valores na produtividade lipolítica e consequentemente diminuição no tempo de obtenção do valor máximo de atividade.

O processo mais utilizado para a produção de lipases é a fermentação submersa, que tem como uma das características principais a dispersão de células e nutrientes em meio líquido. A técnica de fermentação submersa apresenta facilidade de cultivo em grande escala, por garantir a homogeneidade do meio de produção como também a facilidade no controle dos parâmetros do processo. Por outro lado, existe a probabilidade de contaminação pela maior quantidade de água utilizada, que nesse caso é um inconveniente desse processo. Quando a enzima produzida é extracelular, existe outra limitação, pois é obtida uma preparação mais diluída, inserindo uma etapa de concentração mais trabalhosa na purificação (CIAFARDINI et al., 2006; MARTNS et al., 2011).

A técnica de fermentação submersa apresenta facilidade de cultivo em grande escala, por garantir a homogeneidade do meio de produção como também a facilidade no controle dos parâmetros do processo. Por outro lado, existe a probabilidade de contaminação pela maior quantidade de água utilizada. Quando a enzima produzida é extracelular, existe outra limitação, pois é obtida uma preparação mais diluída, sendo necessária a etapa de concentração. Para que a fermentação submersa tenha viabilidade econômica esse processo fermentativo precisa ser investigado com reaproveitamento de resíduos (VARDANEGA et al., 2010; YU et al., 2012).

Na fermentação submersa, os principais fatores que afetam o processo são a disponibilidade de carbono, tais como açúcares e outros carboidratos, fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio, íons inorgânicos como fosfato, magnésio, ferro, cobre, manganês e zinco que são necessários para o crescimento. Além dos fatores físicos temperatura, pH e o oxigênio em quantidades suficiente para o desenvolvimento da biomassa (RAJAN, NAIR, 2011).

Nas últimas décadas, a fermentação submersa passou por importantes aperfeiçoamentos, com maior controle do processo num menor período de tempo (5 a 7 dias), além da eficiência, na transferência de oxigênio, remoção de gás carbono e menor risco de contaminação (GODOY et al., 2011).

Na produção de lipases por *Paecylomyces variotti* na presença de substratos: produtos agroindustriais (farelo de soja e farelo de trigo), a 40 °C durante 96 h, Giraldo e colaboradores (2011) fizeram comparação entre a fermentação semi-sólida e a fermentação submersa, esses autores na fermentação submersa observaram que na adição de 1 % de glicose inibi a produção da enzima, enquanto a adição de 1 % de peptona como fonte de nitrogênio, aumentou a produção em 3,7 vezes em relação à fermentação semi-sólida

Segundo Treichel e colaboradores (2009), a comparação quantitativa entre fermentação submersa e fermentação sólida é difícil devido à diferença dos métodos utilizados para determinação da lipases. Mas a literatura mostra algumas informações em relação a comparações qualitativas; Rajan e Nair (2009), obtiveram atividade máxima para

fermentação sólida de 569,10 U e para fermentação submersa de 550,90 U, utilizando *Aspergillus niger* para produção de lipases.

A escolha do processo depende de vários fatores tais como, característica do micro-organismo, qualidade do produto final, as condições econômicas para implantar processo e regulações governamentais para descarte do resíduo sólido ou líquido (WINAYANUWATTIKUN et al., 2011).

Com a finalidade de estudarem o potencial das lipases produzidas por *Aspergillus terreus* para a síntese de glicerídeos na ausência de solventes, Kaushik e colaboradores (2011) utilizaram o meio basal contendo por litro: 2 g de nitrato de sódio, 1 g de caseína, 0,52 g de cloreto de potássio, 0,52 g de sulfato de magnésio, 1,52 g de nitrato cupico, 1,52 g de sulfato ferroso, 1,52 g de sulfato de zinco e 20 g de óleo de milho como indutor; foi produzido 7,01 U.mL<sup>-1</sup>. No entanto, a interação da caseína com o nitrato de sódio e óleo de milho como indutor, resultou num aumento de 7 % em 96 h de fermentação a 37 °C e 250 rpm.

Winayanuwattikun e colaboradores (2011) realizaram um estudo com 360 cepas de bactérias, fungos e leveduras para a produção de biodiesel a partir de lipases imobilizadas por micro-organismos lipolíticos, usando óleo de palma como matéria-prima. A bactéria *Staphylococcus warneri*, a levedura *Candida rugosa* e o fungo filamentosos *Fusarium solani*, foram escolhidos devido à específicas atividades. A catálise de transesterificação entre metanol e óleo de palma revelou que lipase imobilizada pela *C. rugosa* foi mais promissora para o desenvolvimento adicional na catálise da síntese de biodiesel. A lipase foi produzida em meio líquido que continha 0,4 % de glicose, 0,6 % de NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 0,1 % de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 % de MgSO<sub>4</sub> e 3 % de óleo de palma. A enzima produzida foi adicionada à mistura da reação, seguido por contínua agitação de 300 rpm, a 40 °C por 6 h.

A tabela 2 exemplifica o potencial da levedura *Y. lipolytica* na produção de lipases dentre outros micro-organismos, utilizando diversos substratos: farelo de soja, gergelim, amêndoa, coco sob cultivo submerso e óleo de oliva como indutor. *Staphylococcus warneri* foi cultivado na presença de glicerol e óleo de oliva e *Aspergillus niger*, na presença de farelo de soja, farinha de trigo, farinha de mandioca e óleo de canola.

Tabela 2 Produção microbiana de lipases por fermentação submersa

Micro-organismo	Resíduo/fonte de carbono	Outros nutrientes	Referências
<i>Y. lipolytica</i>	Soja, gergilim, amêndoa, coco	Extrato de levedura, sulfato de amônio, cloreto de cálcio	Darvishi et al. (2009)
<i>Y. lipolytica</i>	Farelo de trigo, óleo de oliva	Extrato de levedura, sulfato de magnésio, carbonato de cálcio, dihidrogenofosfato de potássio	Kebabci, Cihang (2012)
<i>Sthaphylococcus warneri</i>	Glicerol, óleo de oliva	Extrato de levedura, peptona	Rech, Volpato (2011)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo, farinha de mandioca, farelo desoja, óleo de canola	Ureia, extrato de levedura, peptona	Brouks, Asamudo (2011)

### 3.6 Substrato alternativo

O desmedido acréscimo populacional e o aumento da atividade industrial originaram nas últimas décadas vários problemas ambientais que vem se tornando cada vez mais críticos e freqüentes. Muitos estudos estão sendo realizados com intuito de desenvolver tecnologias capazes de minimizar o volume e a toxicidade dos efluentes de forma que não haja somente a remoção de substâncias contaminante, mas também sua completa mineralização (SILVA, ROSTON, 2010).

Vários substratos estão sendo utilizados com potencial aplicação em processos de conversão química ou microbiana em produtos de interesse comercial. Esses materiais se destacam pela a abundância, que nesse caso vai depender do tipo do substrato existente em cada região do país, além de ser uma alternativa na redução desses rejeitos no meio ambiente (BRIÃO, TAVARES, 2007; ALBERTON et al., 2010).

O Brasil apresenta um grande potencial na produção de recursos renováveis, tais como produtos agrícolas, florestais e materiais lignocelulósico, destacando-se o bagaço e palha de cana; sabugo e palha de milho; palha de trigo e arroz; restos de madeira processada e lixo baseado em papel. Em relação aos resíduos provenientes de biomassa

alimentícia, a quantidade total gerada em nosso país atinge cerca de 350 milhões de toneladas/ano valor esse que não pode ser desdenhado e exige que esses materiais tenham um aproveitamento mais racional (SILVA, ROSTON, 2010).

Os resíduos agrícolas em geral, contêm cerca de 20 a 60 % de celulose 20 a 30 % de hemicelulose e 15 a 30 % de lignina, o bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e de arroz, por exemplo, contêm cerca de 25 a 40 % de celulose, 20 a 35 % de hemicelulose e 15 a 35 % de lignina. Esses materiais podem ser utilizados como substratos em processos fermentativos, pois mais de 70 % da matéria seca é constituída de carboidratos (BON et al., 2008). A maior parte apresenta-se como celulose uma  $\beta$  (1-4) glucana que pode ser convertida em glicose. As hemiceluloses são heteropolímeros de pentoses e hexoses e correspondem de 10 a 40 % da matéria seca dos resíduos lignocelulósicos, onde essa fração pode ser convertida em açúcares monoméricos, como a xilose em temperaturas a baixo de 200 °C na presença de ácidos diluídos (BON et al., 2008).

Outro resíduo indústria que merece destaque é o soro de queijo, considerado o principal subproduto da indústria láctea representando 85 - 90 % do volume do leite utilizado na fabricação do queijo. Esse resíduo tem se mostrado útil como substrato na produção de enzimas, como também outros produtos de interesse comercial, tornando-se uma alternativa viável para diminuir os custos da produção desses produtos (MATOS et al., 2010).

Um dos principais obstáculos na aplicação de enzimas na indústria está no elevado custo da sua produção. Considera-se que o substrato para o desenvolvimento desses micro-organismos corresponde à faixa de 30 a 40 % do custo da produção de enzimas em escala industrial, sendo a pesquisa de metodologias e substratos alternativos de suma importância na escala industrial (DARVISHI et al., 2009).

Ladeira e colaboradores (2012) utilizaram o soro de queijo e a água de maceração de milho na produção de proteases por *Bacillus sp.* visando a redução dos custos da produção, e obtiveram atividade máxima da proteína de 72,2 U.mg<sup>-1</sup> em 30 horas de fermentação em temperatura de 70°C.

Barbosa e colaboradores (2010) realizaram estudos com o soro de queijo na produção de aguardente por *Saccharomyces cerevisiae* e obtiveram resultados satisfatórios na produção de etanol de 7,33 °GL após 32 h, resultados esses condizentes com a literatura citado por Florentino (2006).

Estudos realizados por Diniz, Druzian, Audibert (2012) na produção de goma xantana por *Xanthomona campestris manihotis*, utilizando como substrato casca de cacau e soro de queijo, obtiveram um resultado de 12,01 g.L<sup>-1</sup> para a produção com o soro de queijo, com um rendimento de 1,6 vezes maior do que com o resíduo da casca do cacau.

Substratos com elevados teor de lipídeos como é o caso dos resíduos da indústria de óleo vegetal, resultantes da degomagem do óleo bruto de soja, pode ser uma alternativa

interessante para minimizar custos na produção de lipases, visto que o grande obstáculo na obtenção desse bioproduto está relacionado a gastos com substratos para o desenvolvimento do micro-organismo. Outra vantagem na utilização desses resíduos como substratos, é que eles podem aumentar a atividade lipolítica (IMANDI, KARAMAN, GARAPATI, 2010).

Alberton e colaboradores (2011) trabalharam com lipases produzidas por *Rhizopus microsporus* por fermentação sólida, de semente de girassol, no tratamento de efluente lácteo com níveis de lipídeos acima de 1300 mg.L<sup>-1</sup>. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL do efluente lácteo, 0,3 g do líquido metabólico com atividade lipolítica de 33 U.g<sup>-1</sup> e incubados por 72 h, a 35 °C e 150 rpm. Foi determinada a diminuição de lipídeos inferior a 300 mg.L<sup>-1</sup>.

Valadão e colaboradores (2007) utilizaram lipases produzidas por *P. restrictum* por fermentação sólida de torta de babaçu, no tratamento de efluente de matadouro aviário. O teor de óleos e gorduras após a separação por flotação variou de 150 a 1200 mg.L<sup>-1</sup>. As amostras foram pré-tratadas com 0,1 0,5 e 1 % do material fermentado e incubadas por 22 h, a 35 °C e 120 rpm. O processo de degradação foi realizado em frascos de Erlenmeyers de 100 mL, contendo 90 mL do efluente bruto. Foi determinada a diminuição de óleos e gorduras na faixa de 150 a 750 mg.mL<sup>-1</sup>.

### 3.7 Tratamento biológico de efluente lácteo

Devido ao elevado crescimento populacional e o aumento da atividade industrial, problemas ambientais têm sido freqüentes. Com isso é notável alterações na qualidade do solo, ar e água. Dentro desse contexto, a indústria de laticínios apresenta um especial destaque, devido ao grande volume de água necessário para o beneficiamento do leite colocando-as como uma das principais geradoras de efluentes industriais. Segundo a literatura, para cada litro de leite beneficiados gera em media 2,5 litros de efluente (MATOS et al., 2010).

Devido à grande quantidade de lipídios, carboidratos e proteínas presentes nesses efluentes, eles se apresentam com uma elevada demanda química e bioquímica de oxigênio, atribuindo ao sistema uma alta carga orgânica. O lançamento dessas águas residuais sem o tratamento adequado nos corpos hídricos reduz de maneira drástica a quantidade de oxigênio presente, colocando em risco todo ecossistema aquático . (MENDES et al., 2005; SALAZAR, FILHO, 2010).

Os processos biológicos são os mais utilizados nesse tipo de efluente devido a sua eficiência e por serem economicamente viável quando comparados com físico-químicos.

Esse tipo de tratamento tem a função de remover a matéria orgânica facilmente biodegradável através do metabolismo de oxidação de síntese das células (RIBEIRO et al., 2011). Segundo Mendes et al. (2005), os tratamentos biológicos de resíduos devem atender alguns requisitos importantes como: redução da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) do resíduo a ser tratado, degradação de compostos químicos orgânicos de difícil degradação (recalcitrante) e fornecimento de um efluente em condições que não afete o equilíbrio do sistema receptor final (lagos e rios). Observa-se na tabela 3, exemplos de águas residuais potencialmente tratáveis por processos biológicos com os respectivos valores de DBO dos rejeitos.

Tabela 3 Valores de DBO para diferentes tipos de águas residuais

<b>Águas residuais</b>	<b>DBO (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Esgotos sanitários</b>	200 - 600
<b>Efluente de alimentos (enlatados)</b>	500 – 2.000
<b>Efluente de cervejarias</b>	500 – 2.000
<b>Efluente de processos de óleos comestíveis</b>	15.000 – 20.000
<b>Efluente de destilaria de álcool (vinhaça)</b>	15.000 – 20.000
<b>Percolado de aterros sanitários (chorume)</b>	15.000 – 20.000
<b>Efluente de matadouros</b>	30.000
<b>Efluente de laticínios</b>	40 – 48.000

Fonte: Mendes et al. (2005)

Os produtos biológicos dividem-se em aeróbios e anaeróbios. Nos processos aeróbios a estabilização dos despejos é feita por micro-organismos aeróbios ou facultativos, cuja degradação biológica das substâncias orgânicas complexas ocorre na presença de oxigênio livre, os produtos finais resultante da matéria oxidada se divide em duas etapas, uma delas vai produzir energia para processos vitais, a outra vai ser convertida em novas células, onde sem a presença da matéria orgânica há necessidade de metabolizar suas reservas celulares para obter energia gerando os produtos finais dióxido de carbono, água e outros (CAMMAROTA, FREIRE, 2006).

Nos processos anaeróbios no tratamento de rejeitos, a decomposição da matéria orgânica é realizada na ausência do oxigênio, nessa degradação ocorrem reações que reduzem as dimensões das partículas, tornando-as solúveis quebrando as cadeias triplas ou duplas existentes; os produtos finais do processo são metano, compostos orgânicos, dióxido de carbono, ácido sulfídrico e amônia (MORAIS, 2005).

Várias vantagens podem ser observadas no processo biológico anaeróbio: baixo consumo de energia, baixos custos de implantação, baixo consumo de nutrientes,

aplicabilidade em pequena e grande escala. Não necessitando de equipamentos de aeração artificial nesse processo, há geração de biogás ( $\text{CH}_4$ ) podendo ser aproveitado na indústria como fonte de energia. Uma das desvantagens encontrada nesse processo é a apresentação de problemas na presença de efluentes com elevados teores de gordura tais como desenvolvimentos de lodos com baixa atividade, características físicas inadequadas e com elevada tendência a flotação, além da baixa produção de biomassa, apenas 10 - 20 % do volume produzido pelo o aeróbio devido à reduzida taxa de crescimento dos microorganismos no consórcio anaeróbio (MENDES et al., 2006; ROSA, 2004).

Os lipídios presentes nos efluentes representam uma perda industrial importante, além de interferir negativamente nos Sistemas de Tratamento de Efluente. Vários problemas podem ser detectados quando elevadas concentrações de lipídios estão presentes, alguns deles são: formação de lodos com diferentes características físicas e reduzida atividade hidrolítica devido à flotação dessa biomassa, aumento do tempo de retenção hidráulica desses efluentes nas lagoas de estabilização, redução na capacidade de aeradores e elevada demanda de produtos flocculantes (PEREIRA et al., 2003; VIDAL et al., 2000; ALBERTON et al., 2010)

Processos alternativos vêm sendo utilizados com a finalidade de reduzir lipídios presentes em efluentes com elevada carga orgânica por meio da ação das enzimas, particularmente lipases. Essas enzimas são catalisadores que tem muita aplicação, apresentando uma importância particular pelo fato de hidrolisarem óleos e gorduras que pode ser de grande importância para o tratamento de efluente com elevado teor de gordura (MENDES et al., 2005).

As lipases pertencem ao grupo das enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa, catalizando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas e liberando ácidos e alcoóis orgânicos presente em acilglicerois. Com a sua utilização os níveis de sólidos suspensos e lipídios vão ser reduzidos, possibilitando melhores condições no tratamento anaeróbio, desobstrução de filmes de óleos em tubulações com aumento da vida útil dos equipamentos (BON et al., 2008; DARVISHI et al., 2009; NWUCHE, OGBONNA, 2011; GODOY et al., 2010).

A aplicação de preparado enzimático sólido (PES) produzido pelo *Penicillium simplicissimum* rico em lipase foi avaliado por Valente et al. (2011) no tratamento de efluente da indústria de conservas de pescado. Com relação à redução de DQO, os valores obtidos foram de 91 a 95 % com o efluente contendo óleos e gorduras na faixa de  $1500 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Preparações de lipases comerciais de origem animal foram estudadas por Mendes e Castro (2005) para redução do teor de lipídeos presentes em efluentes das indústrias de produtos lácteos, o soro de queijo foi usado como substrato representativo para determinar a influência das variáveis na hidrólise de óleos e gorduras presentes no efluente e



constatarem ao final do tratamento enzimático concentrações de ácidos graxos próximos a zero. Cammorota e colaboradores (2006), ao realizarem estudos utilizando material sólido fermentado por *Penicillium restrictum*, obtiveram 90% de remoção de óleos e gorduras após 40 dias de operação em reator anaeróbio de efluentes lácteos contendo entre 203 a 869 mg/L de óleos e gorduras. Leal e colaboradores (2006) também realizaram estudos utilizando lipases produzidas por *P. restrictum* na presença de torta de babaçu para a degradação de óleos e gorduras de efluentes lácteos semi-sintético, contendo 2 g/L de leite em pó com concentrações de lipídeos na faixa de 200 a 1000 mg/L e obtiveram 91% de remoção de lipídeos após 12 h de tratamento a temperatura de 30 °C.

Jeganathan e colaboradores (2006) obtiveram remoção de óleos e gorduras entre 30 a 40 % ao final de três dias de tratamento do efluente de indústria de alimentos de animais domésticos com lipases de *Candida rugosa*, imobilizadas em alginato de sódio, apresentando atividade lipolítica de 760 U.mg<sup>-1</sup>. Os efluentes foram hidrolisados com concentrações de lipase imobilizada entre 0,6 e 1,2 g.L<sup>-1</sup>.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, D.; MITHELL, D. A.; CARDOVA, J.; ZZAMORA, P.; KRIEGER, N. Production of a ferment solid containing lipases of *Rhizopus microporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. **Food Science and Thechnology**, v. 48, p. 28-35, 2010.

BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J. L.; JOUVE, C. M.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 48, p. 375-387, 2009.

BAPTISTA, N. M. Q.; SANTOS, A. C.; ARRUDA, F. V. F.; GUSMÃO, N. B. Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos. **Scientia Plena**, v. 8, p. 1-7, 2012.

BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B. Seleção de microrganismo produtores de enzimas hidrolíticas isoladas de região de Santa Catarina, Brasil. **Evidencia**, v. 11, p. 15-28, 2011.

BHUSHAN, I.; YADAU, A. K.; PARSHAD, R. Enhancement in the production of lipase from *Arthrobacter sp.* Using fed-bath fermentation strategy. **Jornal Biotecnology**, v. 2, p. 522-534, 2011.

BROOKS, A. A.; ASAMUDO, N. U. Lipase production by strains of *Aspergillus* species isolated from contaminated body creams. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 3, p. 311-316, 2011.

CARVALHO, R. G.; CORRÊA, T. L. R.; SILVA, J. C. M.; VIANA, A. P.; MARTINS, M. L. L. Otimização das condições de cultivo para produção de amilases pelo termofílico *Bacillus sp.* e hidrólise de amido pela ação da enzima. **Ciências e Tecnologia da Alimentação**, v. 28, p. 380-386, 2008.

DARVISHI, F.; NAHVI, I.; ESFAHANI, H. A.; MOMENBEIK, F. Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 1, p. 1-7, 2009.

DEIVE, F. J.; ALVAREZ, M. S.; MORAN, M. P.; SANROMAN, A.; LONGO, M. A. A process for extracellular thermostable lipase production by a novel *Bacillus thermoamylovorans* strain. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 3, p. 1-11, 2011.

DHILLON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K.; VERMAN, M. Potencial of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulose bioproduction through solid-state fermentation. **Industria Crops Production**, v. 38, p. 6-13, 2012.

DAILTON, E. R.; VEITES, R. L.; CARVALHO, L. R.; SIMON, J. W.; RUSSO, V. C. Avaliação sensorial do guacamole com adição de alfa-amilase e ácido ascórbico conservado pelo frio. **Ciências e Tecnologia**, v. 58, p. 140-148, 2011.

FERNANDES, F. M. P. G.; BOSCOLO, M.; CRUZ, C. H. G. Influência da composição do meio para a produção de *Zymomonas mobilis*. **Acta Scientiarum Technology**, v. 32, p. 21-26, 2010.

FÉLIX, V. G.; FÉLIX, C. R.; FRANCO, C. R. Bacterias periodontais e produção de proteases. **Oral sciences**, v. 2, p. 23-31, 2010.

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Lipases em biocatálise. In: E. P. S. BON, M. A. FERRARA, M. L. CORVO. **Enzimas em biotecnologia - produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 369 -385.

FARIAS, C. S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ, V. F.; NETO, V. M.; COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substrato para avaliação de celulase por fermentação ssi-sólida. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 1, p. 13, 2008.

GODOY, M. G.; MELISSA L. E. GUTARRA, M. L. E.; CASTRO, A. M.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, D. M. G. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. **Microbiol Biotechnol**, v. 38, p. 945-953, 2011.

IFTIKHAR, T.; NIAZ, M.; ZIA, M. A.; SADAF, M.; JABEEN, R. Production potential of locally isolated strain of *fusarium solani* (mbl 24) for extracellular lipases. **Pak. J. Bot**, v. 44, p. 393-398, 2012.

IMANDI, S. B.; KARANAM, S. K.; GARAPATI, H.R. Optimization of process parameters for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from niger seed oil cake (*Guizotia ayssinica*). **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 2, p. 28-36, 2010.

ILLANES, A. Enzyme production. In: \_\_\_\_\_. **Enzyme Biocatalysis – Principles and Applications**. Springer: Chile, 2008. p. 57-106.

KAUSHIK, R.; MARWAH, R. G.; GUPTA, P.; SARAN, S.; SASO, L.; PARMAR, V. S.; R. K. SAXENA, R. K. Optimization of lipase production from *Aspergillus terreus* by response surface methodology and its potential for synthesis of partial glycerides under solvent free conditions. **Journal Microbiol.**, v. 50, p. 456-462, 2011.

KEMPKA, A. P.; LIPKE, M. L.; PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIM, S.; TREICHEL. H.; FREIRE, D. M. G.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase, from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 31, p. 119-125, 2008.

KEBABCI, O.; CİHANGİR, N. Comparison of three *Yarrowia lipolytica* strains for lipase production: NBRC 1658, IFO 1195 and a local strain. **Turk J Biol**, v. 36, p. 15-24, 2012.

KRANTHI, V. S.; RAO, D. M.; JAGANMOHAN, P. Production protease by *Aspergillus flavus* through solid state fermentation using different oil seed cakes. **International Journal of Microbiological Research**, v. 3, p. 12-15, 2012.

KUMAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, A.; DEEPAK SINGH, D. Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: Production, Purification and Some Prop. **Sciences Journal**, v. 16, p. 940-948, 2012.

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. D.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, L. A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra de Salitre Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina, Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 266-272, 2009.

MARTINS, S.; MUSSATO, S. J.; AVILA, G. M.; AGUILAR, C. N.; TEICHEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 365-373, 2011.

MATEUS, G. G.; GUATARRA, M. L. E.; CASTRO, A. M.; OLGA, L. T. MACHADO, O. L. T.; FREIR, D. M. G. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. **Microbiol Biotechnol**, v. 38, p. 945-953, 2012.

MOON, E. J.; KIM, J. W.; KIM, C. K. Fabrication of membranes for the liquid separation Part 2: Microfiltration membranes prepared from immiscible blends containing polysulfone and poly(1-vinylpyrrolidone-co-acrylonitrile) copolymers. **Journal of Membrane Science**, v. 274, p.244-251, 2006.

MACHADO, B. A. S.; REIS, J. H. O.; FIGUEIREDO, T. U. B.; DRUZIAN, J. J. Mapeamento tecnológico da gomo xantana com enfoque em pedidos de patentes depositados no mundo entre 1970 a 2009. **Gestão, Inovação e Tecnologia**, v. 2, 2009.

NANDI, B. K.; UPPALURI, R.; PURKAIT, M.K. Preparation and characterization of low cost ceramic membranes for microfiltration applications. **Applied Clay Science**, v. 42, n. 1-2, p. 102-110, 2008.

NAVARRO, A. S.; GEA, T.; BARRENA, R.; SANCHEZ, A. Production of lipases by solid state fermentation using vegetable oil-refining watts. **Bioreusource Technology**, v. 102, p. 1080-1082, 2011.

NWUCHE, C. O.; OGBONNA, J. C. Isolation of lipase producing fungi from palm oil Mill effluent (POME) dump sites at Nsukka. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p. 113-116, 2011.

RAJAN, A.; NAIR, J. A comparative study on alkaline lipase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 in submerged and solid-state fermentation using economically and industrially feasible substrate. **Furk Biol**, v. 35, p. 569-574, 2011.

RIGO, L.; NINOW, J. L.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; POLLONI, A. E.; REMONATO, D.; ALBERT, F.; VALDENAGA, R.; OLIVEIRA, D.; TRICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 1132-1137, 2010.

SCHENBERG, A. C. G. Biotecnologia e desenvolvimento sustentável. **Estudo avançado**, v. 24, p. 103-115, 2010.

SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E. S.; CORTES, M. S.; MARTINS, E. S. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 3, p. 28-41, 2009.

SOUZA, S. M. G.; MATHIES, V. D.; FIORAVANZO, R. F. Off-flavor por geosmina e metilisoborneol na aquicultura. **Ciências Agrárias**, v. 33, p. 835, 2012.

SILVA, M. S.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M.; LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Concentration, partial characterization, and immobilization of lipase extract from *P. brevicompctum* by solid-state fermentation of babassu cake and castor bean cake. **Biochemical Biotechnology**, v. 164, p. 755-766, 2011.

SOUZA, O.; SOUZA, M. T. C.; SANTOS, I. E. Tratamento químico de resíduos agrícolas com solução de uréia na alimentação de ruminantes. **Rev. Capril Virtual**, 2007. Disponível em: <<http://www.caprilvirtual.com.br>> . Acesso em: 03 mar. 2011.

THANAPIMMETHA, A.; LUADSONGKRAM, A.; TITAPIWATANAKIUN, B.; SRINOPHAKUW, P. Value added waste of jatropha curcas residue: optimization of protease production in solid state fermentation by taguchi DOE methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 1-5, 2012.

TOMMASO, G.; SOUZA, B. M.; MACEDO, G. C.; GUILHERME SOUSA SILVA, G. S.; KAMIMURA, E. S. Production of lipase from *Candida rugosa* using cheese whey through experimental design and surface response methodology. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p. 1473-1481, 2011.

VARDANEGA, R.; REMONATTO, A.; ARBET, F.; POLLONI, A.; RIGO, E.; NINOW, J. L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. A systematic study on extraction of lipase obtained by solid-state fermentation of soy bean meal by newly isolated strain of *Penicillium sp.* **Food Bioprocess**, v. 3, p. 461-465, 2010.

VAN REIS, R.; ZYDNEY, A. Bioprocess membrane technology: Review. **Journal of Membrane Science**, v. 297, p. 16-50, 2007.

WANG, H.; ZHANG, J.; ANG, X.; DAI, Y. Genome shuffling improves production of the lowtemperature alkalophilic lipase by *Acinetobacter johnso*. **Biotechnol Lettnii**, v. 34, p. 145-151, 2012.

YU, X.; GU, Z.; SHAO, P.; TU, K.; JIN, X. Optimization of solid state fermentation media of *Hericium herinaceus* for soluble dietary fiber using artificial neural networks and genetic algorithms. **Jornal of Biotechnology**, v. 11, p. 2731-2739, 2012.

YUZBASHEVA, E. Y.; YUSBASHEV, T. V.; LAPTEV, I. A.; KONSTANTINOVA, T. K.; SINEOKY, S. P. Efficient cell surface display of Lip2 lipase using C-domains of glycosylphosphatidylinositol-achored cell wall proteins of *Yarrowia lipolytica*. **Microbiol Biotechnol**, v. 91, p. 645-654, 2011.

ZHANG, J.; HU, B. Solid-state fermentation of *Mortierella isabelina* for lipid production from soybean hull. **Biochem Biotechnol**, v. 166, p. 1034-1046, 2012.

## **CAPÍTULO II**

**Degradação de lipídeo de efluente lácteo por bioproduto com  
atividade lipásica produzido por *Yarrowia lipolytica***

**Lipid degradation of a dairy effluent by a bioproduct with  
lipase activity produced by *Yarrowia lipolytica***

**Edson Rodrigues Vieira  
Manoel Gomes Pedroza Neto  
Sérgio Carvalho de Paiva  
Alexandra Amorim Salgueiro**



## Resumo

O objetivo deste trabalho foi degradar óleos e gorduras de efluente lácteo por lipases produzidas por *Yarrowia lipolytica*. Na presença de resíduo de refinaria de óleo vegetal a 3 % v/v e cloreto de amônio a 0,2 g.L<sup>-1</sup> com 48 h a 28 °C, lipases foram produzidas sob cultivo submerso. O líquido metabólico livre de células com atividade lipásica foi estabilizado com sorbato de sódio a 0,5%, glicerol a 5 % e RENEX-95 a 10%. Esse bioproduto apresentou 177 UI.mL<sup>-1</sup> de atividade enzimática com 30 dias sob armazenamento à temperatura ambiente (27-30 °C); pH ótimo 5,0 e 7,0, temperatura ótima igual a 50 °C e estabilidade térmica durante 120 min com retenção de 100 % da atividade enzimática a 50 °C e pH 5,0. A aplicação de 7% do bioproduto durante 12 h de tratamento de efluente lácteo degradou 98% de óleos e gorduras presentes no soro de queijo. As lipases produzidas por *Y. lipolytica* e formuladas com substâncias estabilizadoras têm potencial para serem aplicadas na degradação de óleos e gorduras.

**Palavras-chave:** lipases, estabilidade de enzimas, degradação de lipídeos, efluente lácteo.

## Abstract

The aim of this study was to degrade oils and fats from lipases produced by *Yarrowia lipolytica*. In the presence of a vegetable oil residue at 3 % and ammonium chloride at 0,2 g.L<sup>-1</sup>, during 48 h at 28 °C, lipases were produced under submerged cultivation. The metabolic cell-free liquid was stabilized with sodium sorbate at 0.5 %, glycerol at 5 %, RENEX-95 at 10 %. This bioproduct presented 177 UI.mL<sup>-1</sup> of the lipase activity during 30 days of storage at room temperature (27 - 30 °C); it showed optimum pH at 5.0 and 7.0, optimum temperature of 50 °C and thermal stability for 120 min with retention of 100 % of the enzyme activity at 50 °C and pH 5,0. The application of the bioproduct at 7 % during 12 h degraded 98 % of oils and fats present in cheese whey. The lipases produced by *Y. lipolytica* and formulated with stability agents have potential to be applied in the degradation of oils and fats.

**Keywords:** lipases, enzyme stability, lipid degradation, dairy effluent.

## 1 Introdução

As lipases (EC 3.1.1.3 triacilglicerol acilhidrolases) são enzimas pertencentes à família das hidrolases que apresentam atividade e estabilidade em ambientes aquosos e não-aquosos e que atuam na interfase orgânica-aquosa (FREIRE, CASTILHO, 2008). Apresentam massa molecular variando de 20 a 75 kDa, atividade em pH entre 4,0 a 9,0 e em temperaturas na faixa de 28 a 70 °C (TREVISAN, 2004); atividade ótima na faixa entre 30 e 40 °C enquanto a termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem (ILLANES, 2008; MARTINS *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2010). Esses biocatalisadores catalisam não apenas a hidrólise de lipídeos (triacilglicerídeos), mas também, reações de síntese reversa: esterificação, transesterificação e interesterificação, permitindo a sua utilização na síntese regioseletiva e na resolução estereosseletiva de alcoóis, ácidos carboxílicos e aminas (KAUSHIK *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2012; BRUSHAN, YADAV, PARSHAD, 2011). Estão entre os grupos mais importantes de enzimas, sendo destacadas pela sua versatilidade e aplicações em vários setores biotecnológicos: indústrias alimentícia e farmacêutica; produções de biodiesel, detergentes e cosméticos, além de tratamento de efluentes (BEOPOULOS *et al.*, 2009).

O uso de resíduos industriais como matéria-prima reduz o custo de produção total das enzimas e por outro lado, ajuda a diminuir os impactos ambientais decorrentes de acúmulo desses rejeitos (DARVISHI *et al.*, 2009; FREIRE, CASTILHO, 2008). Uma fonte alternativa de matéria-prima para produção de lipases é o resíduo gorduroso da indústria de óleo vegetal (borra). Durante o processo de refino do óleo, são extraídos os triglicerídeos, os quais compõem o óleo de soja destinado à alimentação humana, permanecendo na borra, ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos (FERNANDES *et al.*, 2007).

Os laticínios constituem uma parcela importante da indústria de alimentos, tanto do ponto de vista econômico quanto social. A geração de resíduos é significativa pelo aumento excessivo das indústrias de laticínios. O soro de queijo representa o principal e o mais problemático subproduto dessas indústrias em decorrência de sua elevada carga orgânica e grande volume gerado (VOURCH *et al.*, 2008). Além disso, esse subproduto representa grandes perdas econômicas para a indústria de laticínios; aproximadamente metade da produção mundial de soro de queijo é disposta em plantas de tratamento de efluente ou utilizada como ração animal (VILLA *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 2010).

Em indústrias brasileiras de pequeno e médio porte, o soro de queijo é freqüentemente descartado diretamente nos corpos d'água, causando impacto ambiental negativo uma vez que as mesmas não dispõem de meios econômicos ou tecnológicos para o adequado

aproveitamento ou tratamento, contribuindo para sérios problemas ambientais, provocando a destruição da flora e da fauna aquática (GUTIÉRREZ *et al.*, 2003; DEMIREL *et al.*, 2005; LEAL *et al.*, 2006; SALAZAR, IZÁRIO-FILHO, 2009). Nesse contexto, investigações vêm sendo realizadas para reduzir concentrações de lipídeos presentes nesses efluentes por ação de enzimas, particularmente lipases que por serem regioespecíficas e não-específicas, apresentam-se como uma das principais enzimas no tratamento de efluente com alto teor de lipídeos (CASTRO *et al.*, 2005; SALAZAR, IZÁRIO-FILHO, 2009).

Dentre os micro-organismos maiores produtores de lipases, destacam-se a *Yarrowia lipolytica*, levedura estritamente aeróbica capaz de produzir metabólitos de valor econômico, o que justifica seu grande uso em indústrias, na biologia molecular e em estudos da genética (HOLZ *et al.*, 2009).

Um diferencial inovador desse trabalho foi o reaproveitamento do resíduo de óleo vegetal como fonte de nutrientes para produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*. Na etapa subsequente, foi desenvolvido um bioproduto com atividade lipolítica estabilizada por formulação e em seguida, caracterizada e aplicada na degradação de óleos e gorduras de efluente lácteo.

## 2 Material e Método

**2.1 Micro-organismo** - *Yarrowia lipolytica* (URM 1120), cedida pela Universidade Federal de Pernambuco UFPE, foi repicada em tubos com meio Sabouraud (glicose, peptona, agar) e incubada a 28 °C por 24 h, armazenada a 4 °C e repicada antes de iniciar os experimentos.

**2.2 Inóculo** - obtido a partir de tubos de cultura com 24 h cujas células foram suspensas em 10 mL de água estéril. A concentração de células foi padronizada em  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> pelo método *pour plate*, com meio Sabouraud e incubação durante 48 h a 28 °C.

**2.3 Meio de produção de lipases** - O meio basal apresentou a seguinte composição (g.L<sup>-1</sup>): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,55; NH<sub>4</sub>Cl 0,6; MgSO<sub>4</sub> 0,5; NaCl 0,1; CaCl<sub>2</sub> 0,1; Tween-80 2. A produção de lipases foi investigada por planejamento fatorial 2<sup>4</sup> com quatro repetições no ponto central cujos fatores investigados foram: resíduo de refinaria de óleos vegetais (1 e 3%v/v), óleo de oliva (0 e 0,2%v/v), NH<sub>4</sub>Cl (0,2 e 1,0%) e pH (5,0 e 9,0) na presença do meio basal. O cultivo foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, (volume útil 100 mL), sob agitação em orbital a 150 rpm e a 28 °C. As amostras foram centrifugadas e filtradas em papel filtro cujo extrato foi utilizado para determinar pH e atividade lipásica com 48, 96 e 120 h de cultivo.

**2.4 Determinação de atividade lipásica** – A atividade foi determinada por titulometria na presença de óleo de oliva emulsionado com goma arábica (1:1) em tampão Tris-HCl a 0,05 mM a pH 7,0, sob agitação a 37 °C por 10 min, utilizando o sistema de reação: 5 mL da emulsão, 2 mL do tampão e 1 mL da amostra. A reação foi interrompida pela adição de 2 mL da solução acetato/etanol (1:1). Os ácidos graxos foram titulados com a solução de NaOH a 0,05 M na presença de fenolftaleína. Os brancos foram preparados substituindo 1 mL da amostra por 1 mL de água estéril. As atividades foram realizadas em triplicata. A unidade internacional de atividade de lipase (UI) foi definida como a quantidade de enzima que produz 1  $\mu$ mol de ácidos graxos por minuto nas condições da reação.

**2.5 Determinações analíticas físico-químicas** - de acordo com a APHA (2005), teor de lipídeos (extração com hexano); segundo metodologias da EMBRAPA (1997): umidade (Ultra-X, KARL KOLB), pH (potenciometria), carbono orgânico (digestão por  $K_2Cr_2O_7$ ) e nitrogênio (micro-Kjeldahl).

**2.6 Formulação do líquido metabólico de *Y. lipolytica*** - Ao líquido metabólico livre de células produzido por *Y. lipolytica*, foram investigados: conservante microbiológico (sorbato de sódio a 0,5 %), detergente comercial (RENEX-95), glicerol e polietilenoglicol (PEG-200) em planejamento fatorial  $2^3$  com quatro repetições no ponto central; a variável resposta foi a atividade enzimática à temperatura ambiente 27-30 °C.

**2.7 Caracterização de líquido metabólico com atividade lipásica, formulado com conservante e estabilizantes** – Foram determinados em triplicata: pH ótimo, temperatura ótima e estabilidade térmica.

**2.8 Tratamento biológico de efluente lácteo** – A degradação de lipídeos do soro de queijo (cedido pela Fábrica Campo da Serra no município de Pombos – PE), foi investigada por planejamento fatorial  $2^2$  com três repetições no ponto central por ação do bioproduto formulado com atividade lipásica, produzido por *Y. lipolytica* (neste trabalho), na presença de nutriente comercial (cedido pelo fabricante). Os resultados foram comparados com experimentos controles, utilizando um bioproduto comercial, indicado para tratamento de efluente (8 g.L<sup>-1</sup>), constituído por células de diferentes micro-organismos, um estabilizante, além de outros componentes. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 500 mL sob agitação de 150 rpm, à temperatura de 28 °C, durante cinco dias, utilizando 250 mL de volume do efluente lácteo.

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Produção de lipases por *Y. lipolytica* sob cultivo submerso

A borra da refinaria de óleos vegetais foi utilizada neste trabalho como nutrientes, visando a diminuir os custos da produção microbiana de lipases, considerando que a composição do meio de cultivo na produção de metabólitos microbianos é responsável por cerca de 30 - 40 % dos custos (SILVA *et al.*, 2009). Esse resíduo, coletado no Porto de Suape em Pernambuco, vem sendo investigado na composição de meios de cultivo em processos biotecnológicos para produção microbiana de enzimas e biosurfactantes (MIRANDA *et al.*, 1999; RUFINO *et al.*, 2007; SOBRINHO *et al.*, 2008; LUNA., 2011; LUNA *et al.*, 2012). Essa matéria-prima, rica em fontes de carbono, é constituída por lipídeos (60 %) e carboidratos (35 %); além desses nutrientes, contém 5% de cinzas, constituída por sódio, magnésio, potássio, zinco e ferro cujos metais são essenciais nos metabolismos de enzimas (MIRANDA *et al.*, 1999).

Nesse trabalho, o resíduo da refinaria de óleo vegetal foi coletado na mesma empresa - localizada no Porto de Suape - congelado após a coleta. Foi determinado: 93% de carbono, ausência de nitrogênio e pH 5,0. Por conseguinte, foi proposto investigar no planejamento fatorial, uma fonte de nitrogênio para produção de lipases por *Y. lipolytica*, utilizando o resíduo da borra da refinaria de óleos vegetais como fonte de carbono.

A produção máxima de lipases por *Y. lipolytica* foi determinada na presença de 3% do resíduo da borra e 0,2% de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a pH 5,0, na ausência do óleo de oliva. Nessa condição de trabalho, a atividade enzimática aumentou ao longo do tempo, atingindo 51, 88 e 91  $\text{U.mL}^{-1}$ , respectivamente com 48, 96 e 120 h de cultivo submerso. Considerando que o menor tempo no cultivo de micro-organismos é primordial em escala industrial devido aos riscos de contaminação; além de que, menor tempo de utilização de reatores na indústria implica em menor custo de produção, por causa dos serviços de água, pressão, agitação, aeração, dentre outros, necessários ao processo fermentativo; por conseguinte, a produção de lipases por *Y. lipolytica* foi interrompida com 48 h por cultivo submerso na presença do resíduo e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a pH inicial 5,0, na continuidade desse trabalho.

Esse mesmo tempo de produção de lipases por *Y. lipolytica* sob fermentação submersa foi selecionado por Darvishi e colaboradores (2009) na presença de substratos oleaginosos de baixo custo com atividade máxima de  $34,6 \text{ U.mL}^{-1}$ , como também por Kebabci e Cihangir (2012), utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, na ausência do óleo de oliva com atividade enzimática máxima de  $10,67 \text{ U.mL}^{-1}$ , a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 4,6 sob agitação orbital de

150 rpm. Os resultados reportados na literatura em relação à atividade de enzimas são de difícil comparação entre si, considerando os diferentes métodos fermentativos, meios e microorganismos empregados.

O óleo de oliva (azeite) foi investigado na produção de lipases por *Y. lipolytica* (nos níveis 0 e 0,2%v/v), por ser um dos indutores mais utilizados na produção desse biocatalizador quando comparado com outros óleos (BEOPOULOS *et al.*, 2009; DARVISHI *et al.*, 2009; FIAMETTI *et al.*, 2011; IFTIKHAR *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2012; MESSIAS *et al.*, 2013; NAJAR *et al.*, 2011; NUNES, PIRES-CABRAL, FERREIRA-DIAS, 2011; ROVEDA, HEMKEMEIER, COLLA, 2010; TREICHEL *et al.*, 2010). Por outro lado, a literatura apresenta trabalhos publicados de produção de lipases cujas atividades máximas foram determinadas na ausência do óleo de oliva, corroborando com os resultados determinados nesse trabalho (IMANDI, KARAMAN, GARAPATI, 2010; KEBABCI, CIHANGIR, 2012).

A figura 1 ilustra o diagrama de Pareto do planejamento fatorial  $2^4$  com quatro repetições no ponto central, referente à produção de lipases por *Y. lipolytica* no tempo de 48 h de fermentação submersa em função das variáveis independentes investigadas (resíduo, azeite,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e pH).

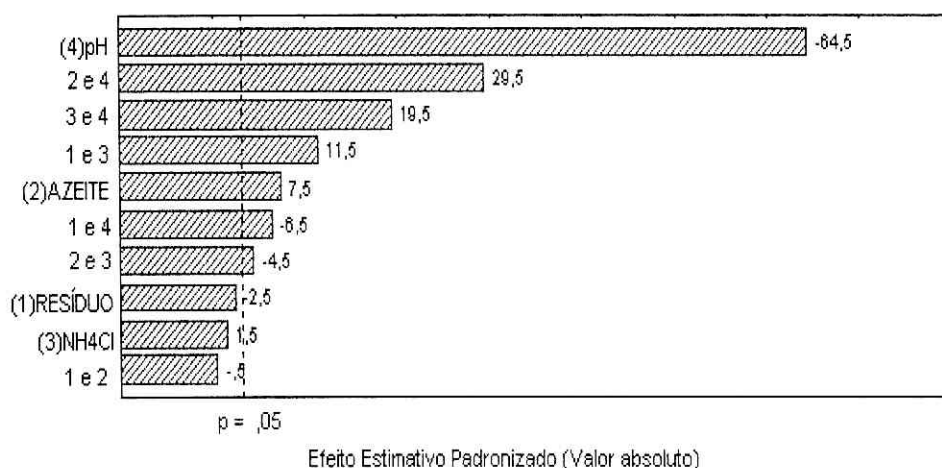


Figura 1 Diagrama de Pareto da produção de lipases por *Y. lipolytica* com 48 h de cultivo submerso, em função das variáveis independentes: resíduo (1), azeite (2),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (3) e pH (4)

\*A linha tracejada vertical indica o ponto no qual os efeitos estimados foram estatisticamente significativos.

O pH exerceu um efeito negativo na atividade lipásica de *Y. lipolytica*; isto é, quando esse parâmetro aumentou de pH 5 a pH 9 na composição do meio de cultivo (tempo zero do experimento), os resultados de atividade lipolítica diminuíram. Logo, os maiores valores de

atividades enzimáticas foram determinados no líquido metabólico livre de células quando o valor inicial desse parâmetro físico-químico foi pH 5,0. Nesses ensaios, houve produção de metabólitos de caráter alcalino pela *Y. lipolytica* por ter sido determinada uma elevação do pH, atingindo valores em torno de pH 6,0 no líquido metabólico livre de células com 48 h de cultivo.

Essa levedura respondeu diferente metabolicamente quando os meios de produção foram ajustados para pH 7,0 e 9,0 no início do experimento. Um abaixamento no valor desse parâmetro físico-químico foi determinado nos meios com pH inicial 9,0; com 48 h de cultivo submerso foi determinado pH em torno de 7,0 em todos esses ensaios. Por outro lado, não houve alteração do valor de pH nesse mesmo tempo de cultivo, quando o meio de produção foi ajustado para pH 7,0 no início dos experimentos (ensaios no ponto central).

Em função da composição nutritiva do meio de produção de lipases, um mesmo micro-organismo pode apresentar comportamentos fisiológicos diferentes por utilizar vias metabólicas distintas. Lau e colaboradores (2011) produziram lipases por *Burkholderia cenocepacia* sob cultivo submerso na faixa de pH 5,0 a 11; esses autores determinaram o valor máximo de  $191 \text{ UI.mL}^{-1}$ , na presença de substratos oleaginosos como fonte de carbono a pH 9,0 embora a literatura apresente pH ótimo em torno de 7,0 para produção de lipases por essa bactéria, na presença de semente de girassol como fonte de carbono (RATHI *et al.*, 2001; ABADA, 2008).

Apesar do efeito positivo que a variável óleo de oliva exerceu sobre a produção de lipases (figura 1), isto é, o aumento da concentração desse indutor de 0 a 0,2 % v/v favorecer maior atividade enzimática, a condição selecionada na ausência desse óleo foi devido ao menor custo de produção.

Os efeitos das variáveis independentes resíduo e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  apresentaram resultados não significativos (figura 1) enquanto várias interações entre as variáveis independentes apresentaram resultados estatisticamente significativos (95% de significância). O Diagrama de Pareto mostra interações positivas entre óleo de oliva e pH;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e pH; resíduo e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e, interações negativas entre resíduo e pH; óleo de oliva e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (figura.1). Esses resultados são justificados pela fisiologia microbiana da *Y. lipolytica* que apresentou fortes interações entre as variáveis independentes para produção de lipases sob cultivo submerso (TRIVEDI, PANDEY, BHADAURIA, 2010).

### 3.2 Formulação do líquido metabólico livre de células com atividade lipásica produzida por *Y. lipolytica*

A atividade lipásica produzida por *Y. lipolytica* na presença de 3,0 % v/v do resíduo (borra) e 0,2 g.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl, a pH 5,0 apresentou baixa estabilidade (39 UI.mL<sup>-1</sup>) com perda de cerca de 50 % da atividade do líquido metabólico armazenado durante 5 dias sob refrigeração. A amostra controle apresentou apenas 19 UI.mL<sup>-1</sup>, antes da adição dos estabilizantes na formulação.

A justificativa da baixa estabilidade da atividade enzimática é devido a interações físicas e químicas entre resíduos de aminoácidos na estrutura protéica que alteram a conformação espacial da proteína a qual influencia diretamente a função catalítica da enzima. As interações eletrostáticas e as forças de van der Waals intramoleculares influenciam a estabilidade da proteína, além de ligações de hidrogênio, pontes dissulfeto e efeitos hidrofóbicos. Temperatura, pH e atividade de água são fatores físico-químicos que ocasionam também interferência na estrutura envelhada das enzimas (MARANGONI, 2003; NOLTING, 2006; NELSON, COX, 2011).

A estabilidade da conformação protéica depende também de reações químicas. Glicosilação e ligações cruzadas entre resíduos de aminoácidos são favorecidas quando a estrutura apresenta “loops” bem próximos; reação de deamidação sob pH neutro ou alcalino na presença de água e, reação de oxidação da cadeia protéica na presença de oxigênio e luz ocorrem em cadeias protéicas. Quando essas reações ocorrem em região próxima ao centro ativo da enzima, a atividade catalítica pode ser alterada. Outro fenômeno responsável pela baixa estabilidade da atividade da enzima, é a agregação entre as moléculas com precipitação da proteína em função do pH do meio, inativando a enzima (AVANTI, 2012; SANTOS *et al.*, 2012).

A tabela 2.1 apresenta a matriz decodificada do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com quatro repetições no ponto central para a formulação do bioproduto com atividade lipásica produzida por *Y. lipolytica*; a variável resposta: atividade enzimática foi determinada com zero, 12, 21 e 30 dias sob armazenamento à temperatura ambiente para as variáveis independentes: glicerol, RENEX-95 e PEG-200 na presença de sorbato de sódio como conservante microbiológico a 0,5 %.

A influência positiva da adição desses agentes químicos na estabilidade de lipases foi evidenciada pelos valores de atividade enzimática no tempo zero da formulação (tabela 1). A maior atividade lipásica do líquido metabólico formulado (bioproduto) no tempo zero foi determinada na presença de glicerol a 5% e RENEX a 10%, atingindo 96 U.mL<sup>-1</sup> (ensaio 3).



Essa atividade foi cerca de cinco vezes maior ao comparar os resultados com a amostra controle (sem formular). O bioproduto com esses aditivos (ensaio 3) aumentou a atividade durante o armazenamento, atingindo  $177 \text{ UI.mL}^{-1}$  com 30 dias à temperatura ambiente ( $27\text{-}30^\circ\text{C}$ ). Essa formulação foi selecionada para caracterizar e aplicar o bioproduto.

Outras formulações com atividade lipásica semelhante apresentaram concentrações maiores dos aditivos, elevando os custos do produto final. Em adição, atividades enzimáticas elevadas com 12 e 21 dias de armazenamento (ensaios 1, 2 e 5), apresentaram perdas em torno de 26 a 40 % da atividade lipásica (tabela 1).

Tabela 1 Atividades lipásicas do líquido metabólico livre de células ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) na presença de substâncias estabilizadoras de enzimas durante o armazenamento a  $27\text{-}30^\circ\text{C}$

Ensaio	Fatores (%)			Tempo (dias)			
	Glicerol	RENEX	PEG	0	12	21	30
1	5	0	0	35	250	309	123
2	10	0	0	32	226	348	120
3	5	10	0	96	103	116	177
4	10	10	0	60	193	125	180
5	5	0	10	19	233	283	75
6	10	0	10	22	148	247	59
7	5	10	10	77	126	96	166
8	10	10	10	87	99	86	140
9	7,5	5	5	76	123	146	189
10	7,5	5	5	63	146	90	129
11	7,5	5	5	77	118	92	171
12	7,5	5	5	70	132	214	122

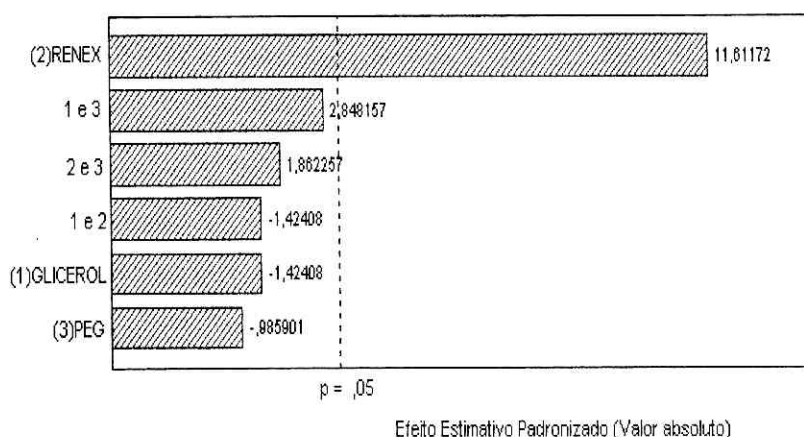
O efeito estabilizante do glicerol (poliol) no bioproduto produzido por *Y. lipolytica* pode ser justificado pelo mecanismo “shell-type” das enzimas quando os aminoácidos envolvidos na reação de deamidação ficam protegidos ou então, por inibição da reação de oxidação da estrutura protéica. Por conseguinte, os polióis e os açúcares são muito aplicados em formulações de enzimas, além de não causarem riscos à saúde e de serem substâncias de baixo custo (BUXBAUM, 2011; NOLTING, 2006).

A estabilização desse bioproduto pelo RENEX-95 (nonilfenol etoxilado) pode ser justificada pelas propriedades do detergente que facilitam a interação da enzima com o

substrato por reduzir a área superficial hidrofóbica e por isso, aumenta a solubilização da enzima, além de diminuir o fenômeno de agregação entre as moléculas protéicas. A literatura ressalta que a quantidade desse estabilizante a ser adicionada nas formulações de enzimas deve ser investigada, considerando a relatividade de atuação de detergente na atividade enzimática (BUXBAUM, 2011).

Apesar da adição de polímeros em formulados enzimáticos ocasionar diminuição da atividade de água do meio e evitar a reação de deamidação na molécula de enzima devido ao aumento da viscosidade do produto formulado, a presença do PEG-200 no bioproduto desenvolvido neste trabalho, não influenciou a estabilidade catalítica (ILLANES, 1999).

A figura 2 ilustra o diagrama de Pareto referente ao planejamento fatorial  $2^3$  com quatro repetições no ponto central para formulação do bioproduto produzido por *Y. lipolytica* contendo atividade lipásica na presença de conservante microbiológico. A única variável investigada que apresentou efeito estatisticamente significativo foi o RENEX; o aumento da concentração desse detergente de 0 a 10% aumentou a estabilidade da lipase do bioproduto devido ao efeito positivo na atividade enzimática.



\* A linha tracejada vertical indica o ponto no qual os efeitos estimados foram estatisticamente significativos.

Figura 2 Diagrama de Pareto do planejamento fatorial  $2^3$  com quatro repetições no ponto central para formulação do bioproduto de *Y. lipolytica*

### 3.3 Caracterização do bioproduto com atividade lipásica quanto ao pH e à temperatura

A figura 3 apresenta o pH ótimo em função dos resultados de atividade lipásica determinados no líquido metabólico livre de células produzido por *Y. lipolytica*, formulado com sorbato de sódio (0,5 %), glicerol (5 %) e RENEX (10 %). As atividades enzimáticas

foram determinadas em tampão acetato de sódio a pH 5,0 e 5,5, em tampão fosfato de sódio a pH 6,5 e em tampão Tris-HCl a pH 7,0 e 7,5, sob temperatura igual a 37 °C.

As maiores atividades lipásicas do bioproduto formulado produzido por *Y. lipolytica* foram determinadas em pH 5,0 (103 U.mL<sup>-1</sup>) e em pH 7,0 (102 U.mL<sup>-1</sup>). Esses valores determinados de pH ótimo estão de acordo com os dados da literatura para outras lipases microbianas produzidas por diferentes culturas: *Penicillium* sp. (RIGO *et al.*, 2010), *Burkholderia cenocepacia* (LAU *et al.*, 2011), *Fusarium solani* (IFTIKHAR *et al.* (2012) e *Rhizopus microsporus* (ALBERTON *et al.*, 2010) cujas lipases apresentaram atividade máxima na faixa de pH 5,0 a 9,0.

A figura 3 ilustra a temperatura ótima do bioproduto formulado com atividade lipásica produzido por *Y. lipolytica*. A temperatura ótima da lipase foi igual a 50 °C, determinada em tampão tris-HCl pH 7,0. Ressalta-se que a 70 °C, o bioproduto apresentou cerca de 67 % da atividade máxima. Esse bioproduto produzido pela *Y. lipolytica* com atividade lipásica em temperatura elevada apresenta vantagem para aplicação industrial.

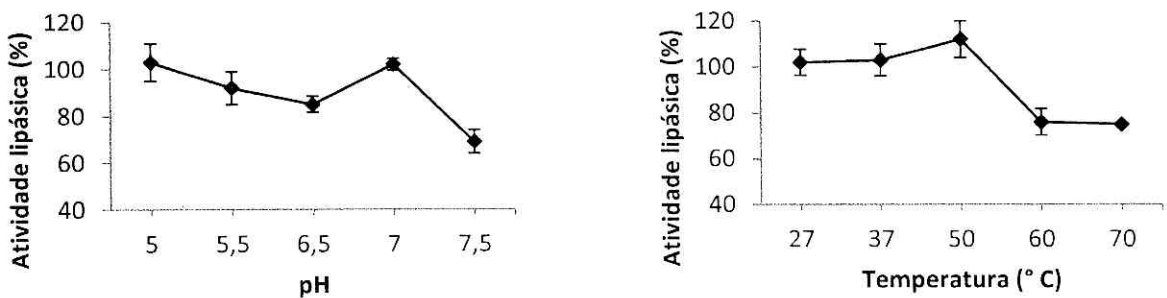


Figura 3 pH ótimo e temperatura ótima do líquido metabólico formulado com atividade lipásica produzida por *Y. lipolytica*

A figura 4 ilustra as estabilidades térmicas a 28 e 50 °C do líquido metabólico livre de células e formulado com atividade lipásica em pH 5,0, produzida por *Y. lipolytica*. As amostras foram incubadas em triplicata sob agitação orbital de 100 rpm durante 30 a 120 min e a atividade lipásica. A maior termoestabilidade foi determinada a 50 °C quando as amostras apresentaram 100 % da atividade lipásica durante os 120 min de incubação. Esse bioproduto contendo lipase produzida por *Y. lipolytica*, após incubação a 28 °C nas mesmas condições de trabalho, apresentou perda de 26 % de atividade enzimática após 120 min de incubação.

A literatura apresenta lipases termófilas produzidas por diferentes micro-organismos na presença de condições nutritivas diversas. Khoramnia e colaboradores (2011) ao

caracterizarem lipases produzidas por *Acinetobacter sp.* em fermentações submersa e sólida, determinaram que a atividade lipásica foi máxima a 45 °C e que manteve 63 % da sua atividade máxima, a 70 °C por 2 horas, além de permanecer estável após 24 h de cultivo em valores de pH 6 a 11, utilizando como substrato óleo de coco. Deive e colaboradores (2012) determinaram a atividade máxima de lipases produzidas por *Bacillus thermoamylovarans*, utilizando óleo de oliva como fonte de carbono, a 55 °C em pH 7,0. Brooks e Asamudo (2012) relataram que as lipases produzidas por duas culturas diferentes de *Aspergillus* na presença de óleo de oliva apresentaram temperatura ótima a 60 °C.

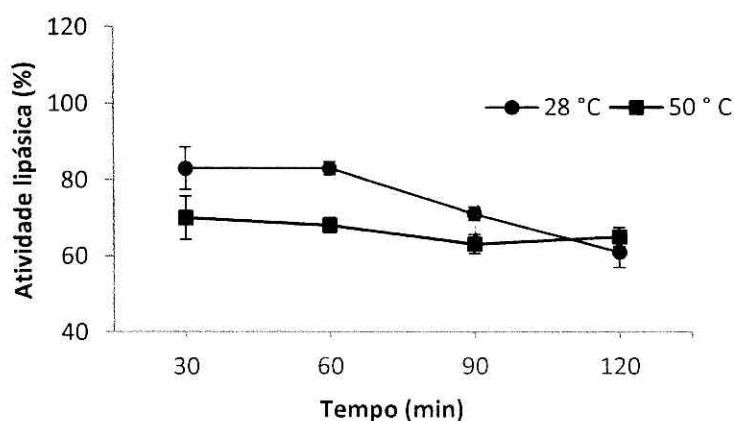


Figura 4 Estabilidades térmicas a pH 5,0 de líquido metabólico formulado com atividade lipásica incubado a 28 e a 50 °C

### 3.4 Aplicação do bioproduto com atividade lipásica em tratamento de efluente lácteo

O soro de queijo apresentou em média 94 % de água, contendo 3.000 mg.L<sup>-1</sup> de óleos e gorduras, 30 % de carbono orgânico e pH 5,0. Por ser um efluente de elevada carga lipídica, é imprescindível que seja submetido a tratamentos para não poluir os corpos hídricos e obedecer à legislação. A literatura recomenda que o teor de óleos e gorduras seja menor que 150 mg.L<sup>-1</sup> nesses efluentes para não prejudicar o desempenho de etapas subsequentes em tratamentos (ALBERTON *et al.*, 2010; VIDAL *et al.*, 2000). Em vários países, o máximo permitido de lipídeos em águas residuárias a serem lançadas em rios corresponde entre 5 e 10 mg.L<sup>-1</sup> (EL-BESTAWY *et al.*, 2005) enquanto no Brasil, o valor permitido é de 50 mg.L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2005).

Os resultados de degradação dos óleos e gorduras do soro de queijo com 12 e 24 h de tratamento biológico pelo bioproduto formulado e produzido por *Y. lipolytica* estão apresentados na tabela 2. A degradação do material oleaginoso aumentou com o tempo do

tratamento biológico, considerando a concentração inicial de lipídeos do efluente lácteo igual a 3.000 mg.L<sup>-1</sup>, a média dos maiores valores determinados foram 76 e 87 %, respectivamente com 12 e 24 h, no ponto central do planejamento fatorial na presença de 4 % do bioproduto de *Y. lipolytica* e 0,02 % do nutriente (ensaios 5, 6 e 7). O menor teor de lipídeos determinado no efluente tratado foi 38 mg.L<sup>-1</sup> com 24 h, cujo valor está compatível com a legislação vigente. O experimento controle na presença do bioproduto comercial degradou no máximo 16 % do teor de lipídeos contido no efluente lácteo com 48 h de tratamento; ressalta-se que por recomendação do fabricante, a máxima eficiência do produto é atingida com cerca de 7 dias de tratamento.

Tabela 2 Degradação de óleos e gorduras em soro de queijo pelo bioproduto com atividade lipásica produzida por *Y. lipolytica*

Ensaio	Bioproduto (%)	Nutriente (%)	Degradação de lipídeos (%)	
			12 h	24 h
1	1	0	17	34
2	7	0	70	78
3	1	0,04	6	74
4	7	0,04	68	79
5	4	0,02	70	81
6	4	0,02	81	85
7	4	0,02	77	95

A literatura apresenta resultados de degradação de lipídeos por lipases microbianas. Valadão e colaboradores (2007) utilizaram lipases produzidas por *P. restrictum* sob fermentação sólida de torta de babaçu no tratamento de efluente de matadouro aviário. O processo de degradação enzimática foi realizado em frascos de Erlenmeyers de 100 mL, contendo 90 mL do efluente bruto. A concentração final de óleos e gorduras atingiu a faixa de 150 a 750 mg.mL<sup>-1</sup> quando amostras do material fermentado (0,1 a 1 %) foram incubadas por 22 h, a 35 °C e 120 rpm.

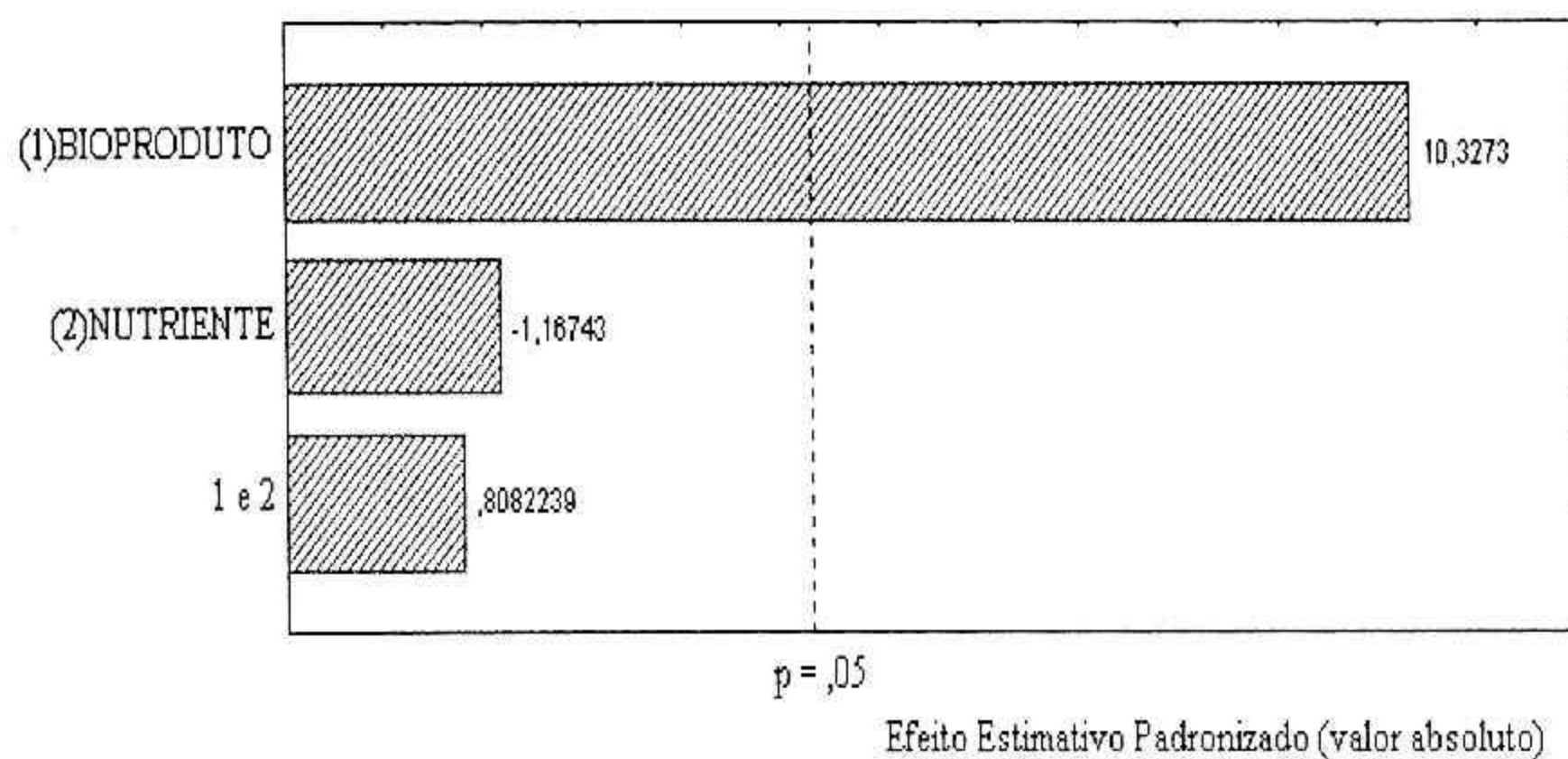
Alberton e colaboradores (2010) trabalharam com lipases produzidas por *Rhizopus microsporus* por fermentação sólida de semente de girassol, no tratamento de efluente lácteo contendo lipídeos acima de 1300 mg.L<sup>-1</sup>. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL do efluente, 0,3 g do líquido metabólico com

atividade lipolítica de  $33 \text{ U.g}^{-1}$  e incubados por 72 h, a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  e 150 rpm. Foi determinada a diminuição de lipídeos inferior a  $300 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Outras técnicas de tratamento de efluente lácteo têm sido investigadas com remoção maior que 90 % do teor de óleos e gorduras. Brião e Tavares (2007) utilizaram a ultrafiltração no processo de tratamento para o reuso do efluente lácteo. Nesse estudo foram testadas duas membranas de ultrafiltração com diferentes tamanhos de poros, uma espiral de polietersulfona e outra tubular de polivinilideno-difluoreto (PVDF); ambas as membranas apresentaram a remoção de lipídeos acima de 90 %. Nessa técnica de tratamento, há possibilidade de recuperação do lipídeo para aplicação industrial embora o custo das membranas filtrantes seja uma desvantagem desse processo.

A figura 5 apresenta o Diagrama de Pareto do planejamento fatorial  $2^2$  referente ao tratamento biológico do soro de queijo pelo bioproduto formulado produzido por *Y. lipolytica*. Dentre as variáveis independentes investigadas, apenas o aumento da concentração do bioproduto apresentou efeito positivo com significância estatística. Ficou constatado que o aumento da degradação de lipídeos do soro de queijo é favorecido pelo aumento da concentração do bioproduto na faixa investigada.

O efluente tratado apresentou  $70 \text{ mg.L}^{-1}$  de óleos e gorduras após 12 h de tratamento com o bioproduto a 7 % (ensaio 2). Houve redução de aproximadamente 98 % dos óleos e gorduras, considerando a presença de  $3.000 \text{ mg.L}^{-1}$  de lipídeos no soro de queijo, independente da presença do nutriente comercial (tabela 2). Esse fato é justificado pela composição físico-química do efluente lácteo, rico em nutrientes, e por isso, a degradação dos lipídeos do soro de queijo na presença apenas do bioproduto produzido por *Y. lipolytica* atingiu eficiência satisfatória.



\* A linha tracejada vertical indica o ponto no qual os efeitos estimados foram estatisticamente significativos.

Figura 5 Diagrama de Pareto do planejamento fatorial  $2^2$  com três repetições no ponto central para tratamento biológico do soro de queijo pelo bioproduto de *Y. lipolytica*

#### 4 Conclusões

- *Y. lipolytica* produz lipases na presença de resíduo de refinaria de óleo vegetal com 48 h sob cultivo submerso a 28 °C;
- o bioproduto com atividade lipásica produzido por *Y. lipolytica* apresentou estabilidade catalítica durante 30 dias sob armazenamento à temperatura de 27 - 30 °C quando formulado com sorbato de sódio a 0,5 %, glicerol a 5 % e RENEX-95 a 10 %, atingindo 177 UI.mL<sup>-1</sup> de atividade lipásica;
- o bioproduto produzido nesse trabalho apresentou pH ótimo 5,0 e 7,0, temperatura ótima igual a 50 °C e estabilidade térmica nessa temperatura, durante 120 min, com retenção de 100 % da atividade enzimática;
- a aplicação de 7 % do bioproduto formulado com atividade lipásica produzido por *Y. lipolytica* no tratamento de efluente lácteo durante 12 h degradou 98 % de óleos e gorduras presentes no soro de queijo.

## 5 Referências

- ABADA, E. A. E. Production and characterization of a mesophilic lipase isolated from *Bacillus stearothermophilus*. *Pakistan Journal of Biological Science*, v. 11 p. 1100-1106, 2008.
- ALBERTON, D.; MITCHELL, D. A.; CORDOVA, J.; PERALTA-ZAMORA, D.; KRIEGER, N. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pré-hidrolisis of a high fat dairy wastewater. *Food Technology and Biotechnology*, v. 48, p. 28-35, 2010.
- APHA - American Public Health Association, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th ed., New York: American Public Health Association. 1995.
- AVANTI, C. Innovative strategies for stabilization of therapeutic peptides in aqueous formulations. Tese. (Doutorado) University of Groningen, Alemanha, 157f. 2012.
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J. L.; JOUVE, C. M.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, v. 48, p. 375-387, 2009.
- BHUSHAN, I.; YADAU, A. K.; PARSHAD, R. Enhancement in the production of lipase from *Arthrobacter sp.* Using fed-batch fermentation strategy. *Journal of Biotechnology*, v. 2, p. 522-534, 2011.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005 - Alterada pelas Resoluções 410/2009 e pela 430/2011. Dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705>>. Acesso em: 10/01/2013.
- BRIÃO, V. B.; TAVARES, C. R. G. Ultrafiltração como Processo de Tratamento para o Reúso de Efluentes de Laticínios. *Engenharia Sanitária Ambiental*, v. 12, p. 134-138, 2007.
- BROOKS, A. A.; ASAMUDO, N. U. Lipase production by strains of *Aspergillus* species isolated from contaminated body creams. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, v. 3, p. 311-316, 2011.
- BUXBAUM, E. *Biophysical Chemistry of Proteins – An Introduction to Laboratory Methods*. Londres: Springer, 2011, 510p.



CAMMAROTA, M. C.; FREIRE D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2005.

DARVISHI, F.; NAHVI, I.; ESFAHANI, H. A.; MOMENBEIK, F. Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 1, p. 1-7, 2009.

DEIVE, F. J.; ALVAREZ, M. S.; MORAN, M. P.; SANROMAN, A.; LONGO, M. A. A process for extracellular thermostable lipase production by a novel *Bacillus thermoamylovorans* strain. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 3, p. 1-11, 2011.

DEMIREL, B.; YENIGUN, O. O. Anaerobic treatment of dairy wastewater: a review. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2583-2595, 2005

EL-BESTAWY, E.; EL-MASRY, M. H.; EL-ADL, N. E. The potentiality of free gram negative bacteria for removing oil and grease from contaminated industrial effluents. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 21, p. 815-822, 2004.

FERNANDES, F. M. P. G.; BOSCOLO, M.; CRUZ, C. H. G. Influência da composição do meio para a produção de *Zymomonas mobilis*. *Acta Scientiarum Technology*, v. 32, p. 21-26, 2010.

FERNANDES, J. I. M.; FREITAS, A.; ROCHADE, L. L. I.; BURIN, A. M.; CORDEIRO, C. P. Resíduo gorduroso da indústria de óleos vegetais substituído ao óleo de soja em rações para francos de corte. *Archives of Veterinary Science*, v. 7, p. 135-141, 2002.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 44, p. 8-13, 2007.

FIAMETTI K. G.; SYCHOSKI, M. M.; CESARO, A.; FURIGO, A. J.; BRETANHA, L. C.; PEREIRA, C. M. P. HELEN TREICHE, H.; OLIVEIRA, OLIVEIRA, J. V. Ultrasound irradiation promoted efficient solvent-free lipase-catalyzed production of mono- and diacylglycerols from olive oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, p. 981-987, 2011.

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Lipases em biocatálise. In: E. P. S. BON, M. A. FERRARA, M. L. CORVO. *Enzimas em biotecnologia - produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 369 -385.

GODOY, M. G.; MELISSA L. E.; GUTARRA, M. L. E.; CASTRO, A. M.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, D. M. G. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 38, p. 945-953, 2011.

GUTIÉRREZ, J. L. R.; ENCINA, P. A. G.; PALANCO, F. F. Anaerobic treatment or cheese production wastewater using a UASB reactor. *Bioresource Technology*, v. 37, p. 271-276, 2003.

HOLZ, M.; ANDRE, F.; STEPHANI, M.; GOROUD, B. Acotinase overopression changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, v. 81, p. 1087-1096, 2009.

IFTIKHAR, T.; NIAZ, M.; ZIA, M. A.; SADAF, M.; JABEEN, R. Production potential of locally isolated strain of *Fusarium solani* (mbl 24) for extracellular lipases. *Pakistan Journal of Botany*, v. 44, p. 393-398, 2012.

ILLANES, A. Stability of biocatalysts. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 2, p. 1-15,1999.

\_\_\_\_\_. *Enzyme Biocatalysis – Principles end Applications*. Chile: Springer, 2008, 290p.

IMANDI, S. B.; KARANAM, S. K.; GARAPATI, H. R. Optimization of process parameters for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from niger seed oil kake (*Guizotiaa ayssinica*). *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, v. 2, p. 28-36, 2010.

JEGANATHAN, J.; BASSI, A.; NAKHLA, G. Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. *Journal of Hazardous Materials*, v. 137, p.121-128, 2006.

JUNG, F.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Impact of enzymatic prehydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. *Biotechnology Letters*, v. 24, p. 1797-1802, 2002.

JUNG, F.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Impact of enzymatic prehydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. *Biotechnology Letters*, v. 24, p. 1797-1802, 2002.

KAUSHIK, R.; MARWAH, R. G.; GUPTA, P.; SARAN, S.; SASO, L.; PARMAR, V. S.; SAXENA, R. K. Optimization of lipase production from *Aspergillus terreus* by response surface methodology and Its potential for synthesis of partial glycerides under solvent free conditions. *Indian Journal of Microbiology*, v. 50, p. 456-462, 2011.

KEBABCI, O.; CIHANGIR, N. Coparation of three *Yarrowia lipolytica* strans for lipase production: NBTC 1658, IFO 1195, AND A LOCAL STRAIN. *Turkish Journal of Biology*, v. 36, p. 15-24, 2010.

KHORAMNIA, A.; EBRAHIMPOUR, A.; BEH, B. K.; LAI, O. M. Production of solvent, detergent, and thermotolerant lipase by a newly isolated *Scinetobacter sp.* in submerged and solid-state fermentations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 12p, 2011.

KUMAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, A.; DEEPAK SINGH, D. Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: production, purification and some properties. *Sciences Journal*, v. 16, p. 940-948, 2012.

LAU, H. L.; ARIFF, A.; WOO, K. K.; LING, T. C.; HII, S. L. Production and optimization of alkalostable lipase by alkalophilic *Burkholderia cenocepacia* ST8. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, p. 7002-7009, 2011.

LEAL, M. C. C. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JR, G. L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 19, 2, 2002.

LEAL, M. C. C. R.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C.; SANT'ANNA JR, G. L. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1173-1178, 2006.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Economic Optimized Medium for Tensio-Active Agent Production by *Candida sphaerica* UCP0995 and Application in the Removal of Hydrophobic Contaminant from Sand. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, p. 2463-2476, 2011.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from

industrial waste by *Candida sphaerica* UCP 0995 for application in the petroleum industry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 102, p. 202-209, 2012.

MARANGONI, A. G. *Enzyme Kinetic – A Modern Approach*. USA: John Wiley & Sons, 2003, 229p.

MARTINS, S.; MUSSATO, S. J.; AVILA, G. M.; AGUILAR, C. N.; TEICHEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 365-373, 2011.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, A. V. Co-produção de lipase e biossurfactantes em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Química Nova*, v. 31, p. 1942-1947, 2008.

MATOS, A. T.; ABRAHÃO, S. S.; MONACO, P. A. V.; SARMENTO, A. P.; MATOS, M. P. Capacidade extratora de plantas em sistemas alagados utilizando no tratamento de águas residuárias de laticínios. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 14, p. 1311-1317, 2010.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO-JÚNIOR, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Química Nova*, v. 28, p. 296-305, 2005.

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodegradation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 32, p. 185-190, 2006.

MIRANDA, O. A.; SALGUEIRO, A. A.; PIMENTEL, M. C. B.; LIMA-FILHO, J. L.; MELO, E. H. M. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. *Bioresource Technology*, v. 69, p. 145-147, 1999.

NAJJAR, A.; ROBERT, S.; GUÉRIN, C.; VIOLET-ASTHER, M.; CARRIÈRE, F. Quantitative lipolysis, and lipid storage in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown in the presence of olive oil: analogies with lipolysis in humans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 89, p. 1947-1969, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NOLTING, B. *Protein Folding Kinetics – Biophysical Methods*. 2<sup>nd</sup> ed. Alemanha: Springer, 2006, 222p.

- NUNES P. A.; PIRES-CABRAL, P.; FERREIRA-DIAS, S. Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food chemistry*, v. 127, p. 993-998, 2011.
- NWUCHE, C. O.; OGBONNA, J. C. Isolation of lipase producing fungi from palm oil Mill effluent (POME) dump sites at Nsukka. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 54, p. 113-116, 2011.
- RAJAN, A.; NAIR, J. A comparative study on alkaline lipase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 in submerged and solid-state fermentation using economically and industrially feasible substrate. *Furk Biology*, v. 35, p. 569-574, 2011.
- RATHI, P.; GOSWAMI, V. K.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Statistical medium optimization and production of a hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia* in bioreactor. *Journal of Applied Microbiology*, v. 9, p. 930-936, 2002.
- RIGO, L.; NINOW, J. L.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; POLLONI, A. E.; REMONATO, D.; ALBERT, F.; VALDENAGA, R.; OLIVEIRA, D.; TRICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *Food Science and Technology*, v. 43, p. 1132-1137, 2010.
- ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, p. 126-131, 2010.
- RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 729-734, 2007.
- SALAZAR, R. F. S.; IZÁRIO-FILHO, H. J. Aplicação de processos oxidativos avançado baseado em fotocatalise heterogênea ( $\text{TiO}_2/\text{UV}_{\text{solar}}$ ) para o pré-tratamento de efluente lácteo. *Revista Eletrônica Del Comitê de Medio Ambiente*, v. 1, p. 27-44, 2009.
- SANTOS, C. R.; PAIVA, J. H.; SFORÇA, M. L.; NEVES, J. L.; NAVARRO, R. Z.; COTA, J.; AKAO, P. K.; HOFFMAM, Z. B.; MEZA, A. N.; SMETANA, J. H.; NOGUEIRA, M. L.; POLIKARPOV, I.; XAVIER-NETO, J.; SQUINA, F. M.; WARD, R. J.; RULLER, R.; ZERI, A. C.; MURAKAMI, M. T. Dissecting structure–function–stability relationships of a thermostable GH5-CBM3 cellulase from *Bacillus subtilis* 168. *Biochemical Journal*, v. 441, p. 95-104, 2012.

- SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E. S.; CORTES, M. S.; MARTINS, E. S. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 3, p. 28-41, 2009.
- SOBRINHO, H. B. S.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SALGUEIRO, A. A.; CAMPOSTAKAKI, G. M.; LEITE, L. F. C.; SARUBBO, L. A. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 912-917, 2008.
- TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. D.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. D. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technology*, v.3, p. 182-196, 2010.
- TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, PIETRO. *Enzimas como Agentes Biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 115-135.
- TRIVEDI, P. C.; PANDEY, S.; BHADAURIA, S. *Text book of Microbiology*. Jaipur: Sheetal Printers, 2010, 446p.
- VALLADÃO, A. B. G.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Enzymatic prehydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultryslaughterhouses. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 60, p. 219-225, 2007.
- VIDAL, G.; CARVALHO, A.; MENDEZ, R.; LEMA, J. M. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 231-239, 2000.
- VILLA, R. D.; SILVA, M. R. A.; NOGUEIRA, R. F. Potencial de aplicação do processo fóton-fenton/solar como pré-tratamento do efluente da indústria de laticíneos. *Química Nova*, v. 30, p. 1799-1803, 2007.
- VOURCH, M.; BALANNEC, B.; CHAUFERB, D. G. G. Treatment of dairy industry wastewater reserve osmosis for water reuse desalination. *Desalination*, v. 219, p. 119-202, 2008.
- ZHANG, J.; HU, B. Solid-state fermentation of *Mortierella isabelina* for lipid production from soybean hull. *Biochemistry and Biotechnology*, v. 166, p. 1034-1046, 2012.