

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Avaliação do Efeito do Ultrassom na Atividade da Enzima Lipase e Aplicação no Tratamento de Efluentes de Laticínios

**Camila T. Marques¹, Simone M. Golunski¹, Jéssica Mulinari¹, Marina Sbardelotto¹,
Aline F. Camargo¹, Camila Dalla Rosa¹, Bruno Venturin¹, Analise Dall Agnol¹,
Daiane P. Baldissareli¹, Gean D. L. P. Vargas¹, Altemir Mossi¹ e Helen Treichel¹**

¹Universidade Federal da Fronteira Sul – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
– 99700-070 Erechim – RS - E-mail: helentreichel@gmail.com

RESUMO

*O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da radiação de ultrassom na atividade lipásica, tendo como variáveis estudadas a temperatura (39, 45 e 54°C), a potência de radiação (30, 50 e 80 Watts) e o tempo de exposição (19, 25 e 34 minutos), para posterior uso em tratamento de efluente de laticínio. Os experimentos foram conduzidos com extrato enzimático bruto obtido utilizando o fungo *Aspergillus niger* e fermentação em estado sólido. Através de um planejamento experimental foi possível verificar a influência da temperatura (45°C), do tempo de exposição (25 min) e da potência das ondas ultrassônicas (50%) na atividade enzimática, onde obteve-se um incremento na atividade hidrolítica em torno 300%. Após o tratamento da enzima com ultrassom, nas condições otimizadas, foi observado um potencial uso no tratamento de efluente de laticínios, visto que, obteve-se um aumento de aproximadamente 430% na concentração de ácidos graxos livres presentes nas amostras analisadas.*

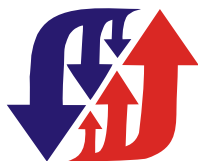
Palavras-chave: Lipase, Ultrassom, Tratamento de Efluentes.

INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas facilmente obtidas a partir de micro-organismos e de células de origem animal e vegetal, sendo um biocatalisador bastante versátil, que pode ser utilizado em biocatalise em meio orgânico e em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação (Shang et al., 2015). Devido a sua especificidade estas enzimas são amplamente aplicadas em diversos processos, como na produção de biodiesel, tratamento de efluentes com elevada carga lipolítica, entre outros (Pastore; Costa; Koblitz, 2003).

A enzima lipase tem sido foco de diversos estudos como uma alternativa promissora para auxiliar na degradação de efluentes ricos em lipídios, principalmente da indústria de laticínios e frigoríficos. (Mendes et al, 2006; Adulkar e Rathod, 2014). Mendes et al. (2006) demonstram o potencial de aplicação de enzimas lipases na redução da carga lipolítica de efluentes da indústria de laticínios, motivando assim o desenvolvimento deste trabalho.

Entretanto, a obtenção comercial da enzima lipase é de alto custo, e desse modo, uma alternativa além da otimização da produção da enzima via fermentação em estado sólido, é a busca de soluções que promovam um incremento na atividade hidrolítica e a estabilidade



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

destas enzimas, dentre elas estão a exposição a radiações, o armazenamento em diferentes temperaturas, mudança de pH e o uso do ultrassom.

Devido à escassez de dados que relatem o uso do ultrassom na melhoria da atividade hidrolítica de lipases, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o desempenho do ultrassom na melhoria da atividade enzimática, bem como avaliar o comportamento da enzima no tratamento de efluente sintético de laticínio.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Enzima Lipase

A lipase utilizada nos ensaios foi obtida após o processo de fermentação em estado sólido, tendo como substrato torta de canola e como micro-organismo produtor o fungo *Aspergillus niger*, em condições controladas de temperatura (27°C), umidade (60% m/m) e nitrogênio (2% m/m) em 48 horas de fermentação. A enzima utilizada foi extraída do meio fermentado utilizando tampão fosfato de sódio 100 mM pH 8,0.

2.2 Tratamento da enzima por ondas ultrassônicas

O extrato enzimático bruto foi avaliado em banho de ultrassom em diferentes condições de temperatura (30, 39, 45, 54 e 60 °C), potência de ultrassom (0, 39.6, 66, 105.6 e 132 watts) e tempo de exposição (10, 19, 25, 34 e 40 minutos), utilizando um planejamento experimental.

2.3 Determinação da Atividade Hidrolítica

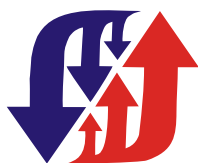
A determinação da capacidade de hidrólise da enzima lipase foi realizada utilizando uma emulsão de óleo de oliva 10% (m/v) e goma arábica 5% (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6. Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições de reação.

2.4 Tratamento de efluentes de laticínios sintético utilizando enzima lipase tratada em ultrassom

Após a determinação da melhor condição experimental com o ultrassom, utilizou-se a enzima para tratar amostras de efluente sintético de laticínios. Foi realizado um planejamento experimental no qual utilizou-se como variáveis, o volume de extrato enzimático (2 - 6mL) e pH do meio reacional (pH 5 - 9). Para os ensaios foi usado 0,2L de efluentes sintético preparado na concentração de 1,7g L⁻¹ de leite em pó integral (Brião e Tavares, 2007), a este foi adicionado o extrato enzimático em volume pré-determinado pelo planejamento, sendo o pH do efluente também ajustado conforme planejamento experimental, o tempo de reação foi 24 horas, a 35°C, com agitação de 160 RPM.

2.5 Determinação de Ácidos Graxos Livres (AGL)

Para a determinação de AGL, alíquotas de 5mL foram retiradas do meio reacional antes e após o período de reação e adicionados 5mL de solução de acetona:etanol (1:1) para cessar a reação enzimática. Esta mistura foi titulada com NaOH 0,02N até pH 11 (Freire et al., 1997).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

RESULTADOS E DISCUSSÕES

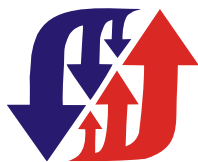
A Tabela 1 apresenta os resultados dos ensaios realizados utilizando o extrato enzimático bruto em diferentes condições de temperatura, tempo de exposição e potência das ondas ultrassônicas.

Tabela 1: Matriz do planejamento experimental realizado (valores codificados e reais) e valores de atividade relativa obtidos.

Ensaio	Tempo (min)		Temperatura (°C)		Potência (%)		Atividade Relativa (%)
	Codificado	Real	Codificado	Real	Codificado	Real	
1	-1	19	-1	39	-1	30	0
2	1	34	-1	39	-1	30	169
3	0	25	0	45	0	50	307
3	0	25	0	45	0	50	306
3	0	25	0	45	0	50	344
4	-1	19	-1	39	1	80	161
5	1	34	-1	39	1	80	0
6	-1	19	1	54	-1	30	0
7	1	34	1	54	-1	30	152
8	-1	19	1	54	1	80	0
9	1	34	1	54	1	80	69
10	0	25	-1,68	30	0	50	17
11	-1,68	10	0	45	0	50	55
12	1,68	40	0	45	0	50	0
13	0	25	0	45	-1,68	0	0
14	0	25	1,68	60	0	50	91
15	0	25	0	45	1,68	100	0

Através da análise da Tabela 1 pode-se constatar que o ponto central do planejamento foi a condição que apresentou maior incremento de atividade, com valores que em média apresentaram-se 319% maiores que a atividade do extrato bruto antes do tratamento. Trabalhos relatam o uso da tecnologia de ultrassom associada ou não a temperatura na inativação de enzimas como a polifenoloxidase, responsável pelo escurecimento de frutas, mostrando que o ultrassom é eficiente na inativação desta enzima mesmo em baixas temperaturas (Sulaiman et al, 2015). No entanto, ainda existem muitas dúvidas para serem elucidadas quanto ao efeito do ultrassom no tratamento de enzimas, visto que, o trabalho desenvolvido por Laes (2013) relata o efeito positivo com o aumento da temperatura quando aplicadas a enzimas amilolíticas.

Também foram realizados ensaios afim de verificar a quantidade de enzima necessária para a melhor conversão de AGL no efluente de laticínios, bem como, a melhor condição de pH. A determinação da quantidade de enzima e pH do meio foi definida, utilizando uma quantidade de AGL inicial do efluente de cerca de 3,5 $\mu\text{mol/mL}$. Através dos resultados obtidos foi possível verificar que a melhor condição para a quantidade de enzima e pH, para o tratamento do efluente de laticínios foi de 6 mL de extrato enzimático tratado em ultrassom com um ajuste em pH 7. Observou-se um aumento de 4,3 vezes na quantidade de AGL



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

presentes na amostra do efluente tratado, isto devido a reação catalítica da enzima lipase que promove a conversão dos lipídios presentes nas amostras em ácidos graxos livres, que são espécies orgânicas com maior biodegradabilidade.

Após a realização dos ensaios para determinar a quantidade de enzima e do pH do meio reacional, buscou-se avaliar o tempo de reação, onde foi utilizado o intervalo de 30 minutos a 24 horas de reação. Foi possível verificar que não houve variações significativas após 16 horas de reação. Sendo assim, assumiu-se este tempo, como limite utilizado para a realização do tratamento enzimático utilizando a lipase tratada em ultrassom.

CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos pode-se observar um incremento de aproximadamente 300 % na atividade enzimática relativa, se comparado a atividade da enzima sem o tratamento com o ultrassom. Desta forma, conclui-se que o uso do ultrassom pode ser uma alternativa bastante promissora na busca de melhorias na atividade hidrolítica da enzima lipase. Também foi possível verificar o potencial para o uso desta enzima submetida ao ultrassom, para posterior tratamento de efluentes com elevada carga de gordura como o de laticínios, visto que se obteve um aumento na quantidade de ácidos graxos livres na ordem de 430% a mais que a concentração inicial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adulkar, TV; Rathod, VK. 2014. Ultrasound assisted enzymatic pre-treatment of high fat content dairy wastewater. *Ultrasonics Sonochemistry* 21:1083–1089.

Brião, VB; Tavares, CRG. 2012. Ultrafiltration of effluents from a dairy industry for nutrient recovery: effect of pressure and tangential velocity. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15:352-362.

Laes, EX, Lima, D, Miklasevicius, L, Ramon, AP, Dal Prá, V, Bassaco, MM, Terra, LM, Mazutti, MA, 2013. Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2:21-25.

Mendes; AA, Pereira, EB, Castro HF, 2006. Effect of enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on anaerobic biodegradation. *Biochemical Engineering Journal*; 32:185-190.

Pastore, GM, Costa, VSR, Koblitz, MGB, 2003. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23:135-140.

Shang, CY, Li, WX, Jiang, F, Zhang, RF, 2015. Improved enzymatic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on ZnO nanowires/macroporous SiO₂ microwave absorbing supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 113:9–13.

Sulaimana, A, Sooa, MJ, Farida, M, Silva, FVM, 2015. Thermosonication for polyphenoloxidase inactivation in fruits: Modeling the ultrasound and thermal kinetics in pear, apple and strawberry purees at different temperatures. *Journal of Food Engineering*, 165:133–140.

Freire DM, Teles EM, Bom EP, Sant'anna Jr. GL. 1997. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 63:63-65.