

## **Aproveitamento de Resíduos da Agroindústria do Dendê como Substratos para Produção de Lipases Microbianas**





ISSN 2177-0395

Dezembro, 2017

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agroenergia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 13***

## **Aproveitamento de Resíduos da Agroindústria do Dendê como Substratos para Produção de Lipases Microbianas**

Andreia Aparecida Jacomassi Carneiro  
Pedro Alves Martins  
Ariel Moura Maia  
Thályta Fraga Pacheco  
Thaís Fabiana Chan Salum

Embrapa Agroenergia  
Brasília, DF  
2017

## **Embrapa Agroenergia**

Parque Estação Biológica (PqEB), s/nº.  
Ed. Embrapa Agroenergia.  
Caixa Postal 40315.  
CEP 70770-901, Brasília, DF.  
Fone: + 55 (61) 3448-158  
Fax: + 55(61)3448-1589  
www.embrapa.br  
<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>

## **Comitê Local de Publicações**

**Presidente:** *Alexandre Alonso Alves*

**Secretária-executiva:** *Marcia Mitiko O. Esquiagola*

**Membros:** *André Pereira Leão*

*Bruno Galvêas Laviola*

*Emerson Leo Schultz*

*Luciane Chedid Melo Borges*

*Maria Iara Pereira Machado*

*Rosana Falcão*

*Sílvia Belém Gonçalves*

Supervisão editorial e revisão de texto

*Luciane Chedid Melo Borges*

Normalização bibliográfica

*Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica

*Maria Goreti Braga dos Santos*

Foto da capa

*Brenda Rabello de Camargo*

## **1ª edição**

Publicação digitalizada (2017)

### **Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Agroenergia

---

Aproveitamento de resíduos da agroindústria do dendê como substratos para produção de lipases microbianas / autores, Andréia A. J. Carneiro ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2017.

16 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroenergia, INSS 2177-0395 ; 13)

Disponível no endereço eletrônico: [www.embrapa.br/agroenergia/publicacoes](http://www.embrapa.br/agroenergia/publicacoes)

1. Lipases microbianas. 2. Fermentação no estado sólido.  
3. Resíduos. 4. Dendê. I. Carneiro, Andréia A. J. II. Série.

# Sumário

<b>Aproveitamento de Resíduos da Agroindústria do Dendê como Substratos para Produção de Lipases Microbianas .....</b>	<b>1</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>9</b>
<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>10</b>
<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>12</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>14</b>
<b>Referências .....</b>	<b>15</b>



# Aproveitamento de Resíduos da Agroindústria do Dendê como Substratos para Produção de Lipases Microbianas

---

*Andreia Aparecida Jacomassi Carneiro*<sup>1</sup>

*Pedro Alves Martins*<sup>2</sup>

*Ariel Moura Maia*<sup>3</sup>

*Thályta Fraga Pacheco*<sup>4</sup>

*Thaís Fabiana Chan Salum*<sup>5</sup>

## Resumo

As lipases microbianas são enzimas amplamente utilizadas em vários setores da indústria e são tradicionalmente produzidas por fermentação submersa. Entretanto, a fermentação no estado sólido (FES) possui como vantagem a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substratos, o que reduz o custo de produção da enzima. Neste trabalho, estudou-se a produção de lipases pelo fungo filamentososo 149, usando farelo de trigo (FT), óleo de soja (indutor de produção de lipases) e quatro resíduos da agroindústria do dendê como substratos para cultivo em FES: torta de palmiste (TP), fibra de prensagem de dendê (FD), borra do decantador (BD) (resíduo da extração do óleo de dendê) e borra de refino de óleo de dendê (BR). O fungo 149 foi cultivado em frascos, nas misturas de substratos: a)

---

<sup>1</sup> Bióloga, doutora em Microbiologia Aplicada, pós-doutoranda da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

<sup>2</sup> Biólogo, mestre em Biologia Molecular, doutorando da Universidade de Brasília, Brasília, DF

<sup>3</sup> Graduando em Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, DF

<sup>4</sup> Engenheira Química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

<sup>5</sup> Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

FT 100%; b) FT 80% e TP 20%; c) FT 50% e TP 50%; d) FT 80% e FD 20%; e) FT 50% e FD 50%; f) FT 80% e BD 20%; g) FT 50% e BD 50%; h) FT 80% e BR 20%; i) FT 50% e BR 50%. Os frascos foram incubados por 7 dias a 30 °C. As atividades lipolíticas mais altas foram obtidas quando o microrganismo foi cultivado na mistura de 80% de farelo de trigo e 20% de borra do decantador ( $239 \pm 16 \text{ U}\cdot\text{gss}^{-1}$ ), na mistura de 80% de farelo de trigo e 20% de borra de refino ( $182 \pm 44 \text{ U}\cdot\text{gss}^{-1}$ ) e na mistura de 80% de farelo de trigo e 20% de torta de palmiste ( $161 \pm 23 \text{ U}\cdot\text{gss}^{-1}$ ).

**Termos para indexação:** lipases microbianas, fermentação no estado sólido, resíduos, dendê.

# Use of Residues from Palm Oil Agroindustry as Substrates for Microbial Lipases Production

---

## Abstract

Microbial lipases are enzymes widely used in various industry sectors and are traditionally produced by submerged fermentation. However, solid state fermentation (SSF) has the advantage of being able to use agro-industrial residues as substrates, which reduces the production cost of the enzyme. In this work we studied lipase production by fungal strain 149 using wheat bran (WB), soybean oil (inducer of lipase production) and four residues from palm oil agro-industry as substrates for cultivation in SSF: palm kernel cake (PKC), palm pressed fibre (PF), palm oil decanter cake (PDC) (residue from palm oil extraction), and palm oil sludge (POS) (alkaline sludge from refining of palm oil). The fungal strain was cultivated in flasks by solid state fermentation in the mixtures of substrates: a) WB 100%; b) WB 80% and PKC 20%; c) WB 50% and PKC 50%; d) WB 80% and PF 20%; e) WB 50% and PF 50%; f) WB 80% and PDC 20%; g) WB 50% and PDC 50%; h) WB 80% and POS 20%; i) WB 50% and POS 50%. Flasks were incubated for 7 days at 30 °C. Highest lipase activities were obtained when the microorganism was cultivated on 80% of wheat bran and 20% of palm oil decanter cake ( $239 \pm 16 \text{ U}\cdot\text{gss}^{-1}$ ), on 80% of wheat bran and 20% of palm oil sludge ( $182 \pm 44 \text{ U}\cdot\text{gss}^{-1}$ ) and on 80% of wheat bran and 20% of palm kernel cake ( $161 \pm 23 \text{ U}\cdot\text{gss}^{-1}$ ).

***Index terms:*** microbial lipases, solid state fermentation, residues, oil palm.

## Introdução

Lipases (EC 3.1.1.3) são biocatalisadores capazes de atuar em diversos tipos de reações, como a hidrólise de triacilgliceróis, a esterificação, a interesterificação e a transesterificação (VILLENEUVE et al., 2000). As lipases estão entre as enzimas comerciais com maior número de aplicações industriais/biotecnológicas. Têm aplicações em indústrias como as de detergentes, de alimentos, de polpa e papel, farmacêutica e de química fina (JAEGER; EGGERT, 2002).

As lipases podem ser obtidas por meio de microrganismos, plantas e animais. Entretanto, a produção industrial de lipases por microrganismos é predominante, visto que são organismos mais fáceis de manipular e seu crescimento é rápido. A produção de lipases e de enzimas microbianas em escala industrial se faz majoritariamente por fermentação submersa, em que os meios de cultivo são líquidos contendo nutrientes solubilizados. Entretanto, outro tipo de fermentação que pode ser utilizado para produzir enzimas é a fermentação no estado sólido (FES). A FES envolve o crescimento de microrganismos em substratos sólidos úmidos, nos quais a fase aquosa é descontínua e a maior parte do espaço interpartículas é preenchida pela fase gasosa, facilitando o processo de transferência de oxigênio (LONSANE et al., 1985). A grande vantagem da FES é a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substrato, que são, em geral, ricos em nutrientes. Assim, a FES tem despertado o interesse de países com abundância de resíduos agroindustriais, visto que estes podem ser utilizados como substratos de baixo custo para geração de bioprodutos de maior valor agregado, como as enzimas microbianas (GOMBERT et al., 1999).

Neste trabalho, utilizou-se farelo de trigo e resíduos da cadeia do dendê para produzir lipases a partir de um fungo filamentosos isolado de frutos de dendê. Os resultados apresentados neste trabalho já foram publicados nos Anais do XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM 2017 (CARNEIRO et al., 2017).

## **Materiais e métodos**

### **Substratos**

Os substratos utilizados para compor os meios de cultivo para a fermentação no estado sólido (FES) utilizando o fungo 149 foram: farelo de trigo (FT), torta de palmiste (TP), fibra de prensagem de dendê (FD), borra do decantador (BD) (resíduo da extração do óleo de dendê) e borra de refino de óleo de dendê (BR). A fibra de prensagem do dendê e a borra do refino do óleo de dendê foram gentilmente doadas pela Agropalma, Belém, Brasil. A torta de palmiste e a borra do decantador foram gentilmente doadas pela Denpasa, Belém, Brasil. O farelo de trigo foi adquirido da Bunge. O óleo de soja refinado foi adquirido da marca Soya.

### **Microrganismo**

O microrganismo utilizado no estudo foi o fungo filamentosso 149, isolado de frutos de dendê e incorporado à Coleção de Microrganismos e Microalgas aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias da Embrapa Agroenergia. O fungo foi crescido em placas de Petri em meio PDA (*potato dextrose agar*) a 28 °C por 10 dias.

### **Fermentação no Estado Sólido (FES)**

Para a fermentação no estado sólido, 4 g (massa seca) de substratos e/ou combinações foram adicionados a frascos Erlenmeyer. Os substratos testados foram misturados nas seguintes proporções: a) FT 100%; b) FT 80% e TP 20%; c) FT 50% e TP 50%; d) FT 80% e FD 20%; e) FT 50% e FD 50%; f) FT 80% e BD 20%; g) FT 50% e BD 50%; h) FT 80% e BR 20%; i) FT 50% e BR 50%. Os substratos foram umedecidos (57% de umidade) com solução tampão fosfato de sódio 100 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7. Aos substratos foram adicionados 5% (m/m)

de óleo de soja como indutor para a produção de lipases. Cada frasco foi inoculado com 1 mL de uma suspensão de esporos do fungo 149 contendo  $4 \times 10^7$  esporos. Os frascos foram incubados a 30 °C por 7 dias. Os experimentos foram realizados em triplicata.

## Extração da lipase

Para a extração da lipase, adicionou-se 20 mL de uma solução extratora aos frascos contendo o sólido fermentado. A solução consistiu em tampão fosfato de sódio  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7 com  $4,44 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de Triton X-100. Os frascos foram mantidos em agitador orbital por 1 h a 32 °C e 190 rpm. Após a extração, filtrou-se a mistura, e o filtrado foi centrifugado a 4 °C por 10 min a  $10.600 \times g$ . O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado para determinação da atividade lipolítica.

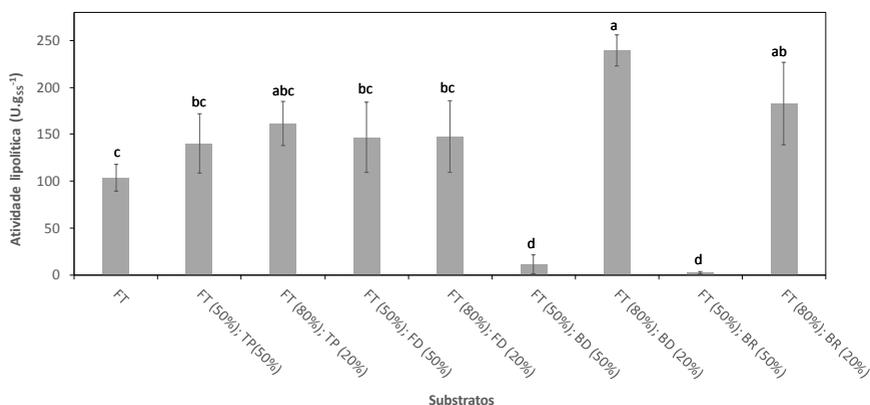
## Determinação da atividade lipolítica

O método utilizado para determinação da atividade lipolítica foi o de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP), que se baseia no método inicialmente descrito por Winkler e Stuckmann (1979). Para o ensaio, 1 mL da solução A (palmitato de *p*-nitrofenila  $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  em isopropanol) foi adicionado a 9 mL de solução B ( $4,44 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de Triton X-100 e  $1,11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de goma arábica em tampão fosfato de sódio  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7) lentamente, com agitação intensa. Uma alíquota de 0,9 mL dessa mistura foi transferida para uma cubeta e adicionou-se 0,1 mL de extrato bruto. A liberação do *p*-nitrofenol (*p*NP), de coloração amarela, foi acompanhada a 410 nm, a 37 °C, a cada 10 s, por 1 min. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de  $1 \mu\text{mol}$  de *p*NP por minuto. A atividade enzimática foi calculada a partir do coeficiente de absorvidade molar do *p*NP, obtido a partir de uma curva de calibração do *p*NP nas mesmas condições do ensaio. A atividade foi expressa por unidades por grama de substrato seco ( $\text{U} \cdot \text{gss}^{-1}$ ).

## Resultados e discussão

Os resíduos da agroindústria do dendê foram utilizados como fonte de nutrição para fungo 149 para a produção da lipase. Os resíduos foram adicionados em diferentes proporções ao farelo de trigo, que foi utilizado como fonte proteica. A quantidade de óleo de soja foi a mesma para todos os experimentos (5% m/m). Após aplicação de Teste de Tukey, com nível de significância de 5%, verificou-se que as atividades lipolíticas para os experimentos contendo torta de palmiste (TP) e fibra de prensagem de dendê (FD) misturados ao farelo de trigo (FT) (independente da proporção) foram estatisticamente iguais ao experimento em que se utilizou somente farelo de trigo (Figura 1). Assim, esses resíduos poderiam substituir parte do farelo de trigo do meio, reduzindo os custos do cultivo sem perda na atividade lipolítica.

As atividades lipolíticas mais altas foram obtidas quando o microrganismo foi cultivado na mistura de 80% de farelo de trigo e 20% de borra do decantador (BD) ( $239 \pm 16 \text{ U}\cdot\text{gss}^{-1}$ ), na mistura de 80% de farelo de trigo e 20% de borra de refino (BR) ( $182 \pm 44 \text{ U}\cdot\text{gss}^{-1}$ ) e na mistura de 80% de farelo de trigo e 20% de torta de palmiste (TP) ( $161 \pm 23 \text{ U}\cdot\text{gss}^{-1}$ ) (Figura 1). A borra do decantador e a torta de palmiste devem ter ajudado na indução da produção de lipases por conter lipídios (ambas contêm cerca de 10% de material graxo). Entretanto, quando se aumentou a proporção de borra do decantador em relação ao farelo de trigo (50% de cada substrato), houve uma redução drástica na atividade lipolítica, o que pode ter sido causada por alguma substância inibidora presente na borra do decantador. A borra do refino do óleo de dendê possui uma quantidade significativa de material graxo (98%) e por isso também deve ter ajudado na indução da produção de lipases, quando utilizado na quantidade de 20%. Entretanto, quando aumentada para 50% na mistura, a atividade lipolítica do extrato bruto caiu drasticamente para  $2,4 \text{ U}\cdot\text{gss}^{-1}$  (Figura 1), possivelmente porque a transferência de oxigênio foi dificultada, devido à quantidade excessiva de material graxo no meio.



**Figura 1.** Atividade lipolítica dos extratos brutos dos cultivos do fungo 149 utilizando resíduos da agroindústria do dendê como substratos. FT (farelo de trigo), TP (torta de palmiste), FD (fibra de prensagem de dendê), BD (borra do decantador) e BR (borra de refino de óleo de dendê). Todas as condições foram adicionadas de óleo de soja 5% (m/m). Condições de cultivo: 30 °C, 7 dias.

Outros autores também já utilizaram resíduos da agroindústria do dendê para a produção de lipases. Penha et al. (2016), por exemplo, utilizaram fibra de prensagem de dendê suplementada com sulfato de amônio e borra de refino de óleo de dendê (3% m/m) como substrato para o cultivo de *Aspergillus niger* 11T53A14 e obtiveram 72,6 U·gss<sup>-1</sup> de atividade lipolítica, determinada por método titulométrico. Riyadi et al. (2017) utilizaram torta de palmiste para a produção de lipases por *Rhizopus* sp. e obtiveram atividade mais baixa (58,63 U·gss<sup>-1</sup>, determinada pelo método de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila), do que as obtidas neste trabalho. Oliveira et al. (2017) também aproveitaram uma torta de palmiste para produção de lipases e obtiveram uma atividade de 61 U·gss<sup>-1</sup> quando determinaram a atividade contra tricaprilina pelo método titulométrico e 460 U·gss<sup>-1</sup> pelo método de hidrólise de butirato de *p*-nitrofenila.

## Conclusões

Atividades lipolíticas significativas foram obtidas quando o fungo filamentososo 149 foi cultivado na mistura de 80% de farelo de trigo e 20% de borra do decantador ( $239 \pm 16 \text{ U}\cdot\text{gss}^{-1}$ ), na mistura de 80% de farelo de trigo e 20% de borra de refino ( $182 \pm 44 \text{ U}\cdot\text{gss}^{-1}$ ) e na mistura de 80% de farelo de trigo e 20% de torta de palmiste ( $161 \pm 23 \text{ U}\cdot\text{gss}^{-1}$ ).

Portanto, os resíduos provenientes da agroindústria do dendê são substratos promissores para composição de meios de cultivo (FES) do fungo filamentososo 149 para a produção de lipases e podem contribuir para a redução do custo de obtenção das enzimas.

## Referências

CARNEIRO, A. A. J.; MARTINS, P. A.; MAIA, A. M.; PACHECO, T. F.; SALUM, T. F. C. Lipases production using residues from palm oil agro-industry. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 21.; SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 12., 2017, Aracajú, SE. [Anais ...]. São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Química, 2017.

GOMBERT, A. K.; PINTO, A. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, Oxon, v. 35, n. 1-2, p. 85-90, 1999.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 7, n. 6, p. 258-265, 1985.

OLIVEIRA, F.; SOUZA, C. E.; PECLAT, V.; SALGADO, J. M.; RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z.; VENANCIO, A.; BELO, I. Optimization of lipase production by *Aspergillus ibericus* from oil cakes and its application in esterification reactions. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 102, p. 268-277, 2017.

PENHA, E. D.; VIANA, L. D. A.; GOTTSCHALK, L. M. F.; TERZI, S. D.; DE SOUZA, E. F.; DE FREITAS, S. C.; SANTOS, J. D.; SALUM, T. F. C. Agro-industrial residues utilization of palm oil for lipase production by *Aspergillus niger*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 4, p. 755-761, 2016.

RIYADI, F. A.; ALAM, M. Z.; SALLEH, M. N.; SALLEH, H. M. Optimization of thermostable organic solvent-tolerant lipase production by thermotolerant *Rhizopus* sp. using solid-state fermentation of palm kernel cake. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 7, artigo 300, 2017.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, Amsterdam, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

**Embrapa**

---

**Agroenergia**

MINISTÉRIO DA  
**AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO**



CGPE 14198