



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS - PPGCA**

**ENZIMAS HIDROLÍTICAS PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS ISOLADOS  
DE AMBIENTE LÓTICO COM POTENCIAL NA BIORREMEDIAÇÃO DE  
EFLUENTES DE LATICÍNIO**

TOLEDO-PR

2021



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS - PPGCA**

**ENZIMAS HIDROLÍTICAS PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS ISOLADOS  
DE AMBIENTE LÓTICO COM POTENCIAL NA BIORREMEDIAÇÃO DE  
EFLUENTES DE LATICÍNIO**

**Marilene Tonin Scherer**

Exame de defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Dra *Cleide Viviane Buzanello Martins*  
Co-orientadora: Dra *Maria Luiza Fernandes Rodrigues*

TOLEDO-PR

2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste

Scherer, Marilene

ENZIMAS HIDROLÍTICAS PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DE AMBIENTE LÓTICO COM POTENCIAL NA BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES DE LATICÍNIO / Marilene Scherer; orientadora Cleide Viviane Buzanello Martins Buzanello Martins; coorientadora Maria Luiza Fernandes Rodrigues Fernandes Rodrigues. -- Toledo, 2021.

35 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, 2021.

1. LEVEDURAS . 2. TRATAMENTO DE EFLUENTES DE LATICÍNIOS.  
I. Buzanello Martins, Cleide Viviane Buzanello Martins, orient. II. Fernandes Rodrigues, Maria Luiza Fernandes Rodrigues, coorient. III. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Marilene Tonin Scherer**

“Enzimas hidrolíticas produzidas por microrganismos isolados de ambiente lótico com potencial na biorremediação de efluentes de laticínio”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

### COMISSÃO EXAMINADORA

---

Profª. Drª. Cleide Viviane B. Martins (Presidente)  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

---

Profª. Drª. Márcia Regina Fagundes Klen  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

---

Prof. Dr. Maurício Ferreira da Rosa  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Aprovada em: 10 de setembro de 2021.

Local de defesa: Via remota síncrona.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
ENZIMAS HIDROLÍTICAS PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DE AMBIENTE LÓTICO COM POTENCIAL NA BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES DE LATICÍNIO .....	11
RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	12
1. INTRODUÇÃO .....	9
2. METODOLOGIA .....	11
2.1. PROCEDIMENTOS DE COLETA E ISOLAMENTO DO MICRORGANISMO.....	11
2.2. <i>Screening</i> DAS LEVEDURAS ISOLADAS.....	13
2.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	14
2.3.1. Produção da lipase por FES .....	14
2.3.2. Preparo do inóculo .....	14
2.3.3. Determinação da Atividade Lipolítica .....	15
2.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO – QUÍMICA DO EFLUENTE.....	17
2.6. CINÉTICA DA BIORREMEDIAÇÃO .....	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
3.1. <i>Screening</i> DE LINHAGENS DE LEVEDURAS .....	18
3.2. PRODUÇÃO DE LIPASES PELA LEVEDURA <i>Apiotrichum mycotoxinivorans</i> .....	20
4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICO DO EFLUENTE.....	23
5. CINÉTICA DA BIORREMEDIAÇÃO .....	25
6. CONCLUSÃO .....	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	31

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

% - Porcentagem

$\Delta t$  - variação de tempo

$\Delta V$  - variação de volume

$\mu\text{L}$  – microlitro

A - Atividade Enzimática

BDA – Batata Dextrose Agar

BHI - Brain Heart Infusion Broth

C - concentração

cm – centímetro

CMC - carboximetilcelulose

DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio

DC – diâmetro do halo das colônias dos isolados

DH - diâmetro do halo descolorido

DQO - Demanda Química de Oxigênio

EC - Comissão Internacional de Enzimas

f - fator de diluição

Fc - Fator de Correção

FES - Fermentação em Estado Sólido

FOG - Grupo de Substâncias Orgânicas

FS - Fermentação em Estado Submerso

FSG - Farelo de Semente de Girassol

g - grama

g L<sup>-1</sup> - Grama por litro

h – hora

HCl - ácido clorídrico

IE - Índice Enzimático

JC - Jéssyca Carvalho

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  - Fosfato de potássico

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  - Fosfato de potássio dibásico anidro

m – massa

mg L<sup>-1</sup> - miligrama por litro

$\text{MgSO}_4$  - Sulfato de magnésio

mL – mililitro

mm - milímetro

mM - milimolar

m/v – massa por volume

YPD - Extrato de Levedura Peptona Dextrose

n - número total de células nos quadrantes da Câmara de Neubauer

Na – Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH - Hidróxido de Sódio

nm – Nanômetro

pH - Potencial hidrogeniônico

UNT - Unidades Nefelométricas de Turbidez

AAP – Andressa Alves Silva Panatta

U gss<sup>-1</sup> – unidades por grama de substrato seco

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Localização geográfica dos pontos de coleta de água para seleção das leveduras no rio Toledo. (Fonte: Google Earth).....	12
<b>Figura 2:</b> Câmara de Neubauer usada para contagem das células. (Fonte: Embrapa) .....	15
<b>Figura 3:</b> Localização geográfica do ponto de coleta de coleta dos resíduos de efluente do laticínio de Santa Lúcia - PR. (Fonte: Google Earth).....	17
<b>Figura 4:</b> A- Quantidade de enzimas e B- Porcentagem de lipases, celulasas, amilases e proteases produzidas de leveduras isoladas do rio Toledo localizadas no município de Toledo PR. ....	20
<b>Figura 5:</b> Linhagem ( <i>Apiotrichum mycotoxinivorans</i> ) inoculada em meio YPD e cloridrato de tetraciclina ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ), incubada por 48 horas a $28^{\circ}\text{C}$ .....	21
<b>Figura 6:</b> Imagem da câmara de UV. Produção de fluorescência da levedura ( <i>Apiotrichum mycotoxinivorans</i> ). (Fonte: próprio autor, 2021).....	21
<b>Figura 7:</b> Cinética de produção de lipase fúngica de ( <i>Apiotrichum mycotoxinivorans</i> ) por fermentação no estado sólido. Os ensaios foram realizados com umidade de 55 %. Experimentos realizados em triplicata com temperatura de $27^{\circ}\text{C}$ .....	22



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Índice Enzimático para as enzimas lipases, celulasas, amilases e proteases produzidas por leveduras isoladas do rio Toledo.....	18
<b>Tabela 2-</b> Caracterização inicial do efluente bruto de indústria de laticínio.....	23
<b>Tabela 3-</b> Resumo comparativo da caracterização físico-químico de efluente de laticínio.....	25
<b>Tabela 4</b> - Carcterização do efluente de laticínio após o processo de biorremediação.....	26

# ENZIMAS HIDROLÍTIICAS PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DE AMBIENTE LÓTICO COM POTENCIAL NA BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES DE LATICÍNIO

[Preparado de acordo com as normas da Revista Biocatalysis and Agricultural Biotechnology]

Marilene Tonin Scherer<sup>1</sup>, Cleide Viviane Buzanello Martins<sup>2</sup>, Maria Luiza Fernandes Rodrigues<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Mestranda do Programa de Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Toledo, PR), [robertalaisat@gmail.com](mailto:robertalaisat@gmail.com)

<sup>2</sup> Prof. Dra. da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Toledo, PR), [mlmfernandes@hotmail.com](mailto:mlmfernandes@hotmail.com), [cvbmartins@gmail.com](mailto:cvbmartins@gmail.com)

## RESUMO

As leveduras representam um grupo muito diverso de microrganismos que produzem enzimas com características peculiares, tais como especificidade, diversidade e capacidade de produção em larga escala. Além disso, apresentam potencial biotecnológico amplo e, também como biorremediação, sendo que, a obtenção de produto nos diversos setores, se dá através de processos fermentativos. O presente trabalho teve como objetivo a produção de enzima hidrolítica a partir de leveduras isoladas do rio Toledo, Toledo-PR, e posterior aplicação no tratamento de águas residuais de laticínio para a remoção de óleos e graxas. A metodologia utilizada inicialmente foi de *cup plate*, que demonstrou índice enzimático promissor. Todas as 24 leveduras testadas foram positivas para pelo menos uma das enzimas estudadas nos testes realizados em placa. Dos isolados, 20 foram positivos para lipases; 11 para amilases; 15 para proteases, e 23 para celulases. O microrganismo selecionado como melhor produtor de lipase para o processo de biorremediação foi a levedura (*Apiotrichum mycotoxinivorans*) JC074, isolada do Rio Toledo no município de Toledo-PR. Esta levedura foi selecionada porque foi a melhor produtora de lipase no teste de *screening*. A lipase foi produzida por FES utilizando farelo de semente de girassol (*Helianthus annuus*) como substrato, com granulometria de entre 1,19 mm (16 Mesh) e 2,0 mm (10 Mesh), 55% umidade, 10<sup>8</sup> esporos/g a 28 °C. A lipase produzida por FES foi utilizada nos experimentos de biorremediação (shaker a 150 rpm, 37 °C e 168 horas) para redução de óleos e graxas (O&G) de um efluente de laticínio do município de Santa Lúcia-PR. Nos experimentos de FES nota-se que a maior atividade lipolítica (111,10

U) foi obtida após 72 horas de fermentação. Nos experimentos de biorremediação, obteve-se uma redução de 79% de óleos e graxas no efluente de laticínio utilizado. Os resultados obtidos foram promissores, concluindo que o tratamento do efluente de indústria de produtos lácteos com extrato enzimático de lipase obtido a partir do isolamento de leveduras de águas continentais é viável, e pode ser utilizado no tratamento do efluente, contribuindo deste modo para a redução do impacto ambiental dos laticínios.

**Palavras-chave:** Lipase; Biorremediação; *Apiotrichum mycotoxinivorans*.

## **ABSTRACT**

Yeasts represent a very diverse group of microorganisms that produce enzymes with peculiar characteristics, such as specificity, diversity and large-scale production capacity. In addition, they have a broad biotechnological potential and, also as bioremediation, and the obtaining of this product takes place through fermentative processes. The present work aimed to produce hydrolytic enzymes from yeasts isolated from the Toledo River, Toledo-PR, and subsequent application in the treatment of dairy wastewater. The methodology initially used was cup plate, which showed promising enzymatic index. All 24 yeasts tested were positive for at least one of the enzymes studied in the plate tests. Of the isolates, 20 were positive for lipases; 11 for amyloses; 15 for proteases, and 23 for cellulases. The microorganism selected for bioremediation processes was yeast (*Apiotrichum mycotoxinivorans*) JC074, isolated from the Toledo River, in the City of Toledo-PR. This yeast was selected because it was the best producer of lipases in the screening test. Lipase was produced by SSF using sunflower seed bran (*Helianthus annuus*) as substrate, with granulometry of between 1.19 mm (16 Mesh) and 2.0 mm (10 Mesh), 55% moisture,  $10^8$  spores/g at 28° C. Lipase produced by SSF was used in bioremediation experiments (shaker at 150 rpm, 37° C and 168 hours) to reduce the oil & greases (O&G) levels of an effluent from a dairy of the municipality of Santa Lucia-PR. In SSF experiments, it was noted that the highest lipolitical activity (111.10 U) was obtained after 72 hours of fermentation. The results obtained were promising concluding that the effluent treatment of the dairy industry with enzymatic extract of lyase obtained from the isolation of

yeasts from continental Waters is feasible, and can be used in the treatment of effluent contributing to the reduction of the environmental impact of dairy products.

**Keywords:** Lipase; Bioremediation; *Apiotrichum mycotoxinivorans*.

## 1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos aquáticos continentais apresentam uma excelente fonte para produção de enzimas com potencial biotecnológico e industrial. Sendo assim, a tecnologia enzimática oferece grandes vantagens na execução de processos tecnologicamente limpos (“*white biotechnology*”), na qual as enzimas hidrolíticas produzidas por diversos microrganismos potencializam sua aplicação em diferentes setores industriais (FRANCISCO, 2016). As enzimas providas de leveduras são utilizadas nas indústrias em diversos setores, como em alimentos e bebidas, produção de compostos químicos, biocombustíveis, têxtil, produção de fármacos, entre outras aplicações (MOURA, 2013).

Dentre os microrganismos utilizados na tecnologia enzimática, estão as leveduras, que são foco de pesquisa deste trabalho e, de recorrentes pesquisas em busca de novos agentes, principalmente devido ao fato da enorme variabilidade e diversidade que ainda não foram estudados (SILVA, 2010).

As leveduras aquáticas são encontradas nos mais diferentes sistemas de água doce como lago, lagoas, rios, águas subterrâneas, geleiras e derretimentos glaciais. Fatores bióticos e abióticos como temperatura, pressão, pH, atividades antrópicas e o tipo e a pureza do ambiente podem afetar a diversidade das leveduras (BRANDÃO *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2012). Com isto, essas leveduras possuem capacidade de produzir naturalmente um grande número de enzimas com capacidade de decompor materiais necessários para seu crescimento e possuem aplicabilidade no âmbito industrial (GOPINATH *et al.*, 2005; ABREU *et al.*, 2015).

O uso das enzimas como biocatalisadores torna-se mais viável do que o uso de catalisadores químicos por diversos motivos, dentre eles, possuem custos reduzidos na produção dos biocatalisadores e redução de subprodutos indesejados devido ao sistema enzima-substrato (seletividade). Essa especificidade das enzimas fornece um maior rendimento no processo, obtendo produtos biodegradáveis (química verde) e gerando menores quantidades de resíduos (MENDES *et al.*, 2011), sendo amplamente empregadas em diversos setores industriais.

As lipases são enzimas que pertencem à família  $\alpha/\beta$  hidrolase (KAPOOR & GUPTA, 2012; PRIJI *et al.*, 2014), não necessitam de um cofator para sua atividade e permanecem ativas em solventes orgânicos (LEE *et al.*, 2015). O elevado rendimento em meio aquoso e orgânico, o reduzido tempo reacional, a estabilidade frente ao pH e temperatura são algumas das propriedades que tornam as lipases os biocatalisadores mais utilizados industrialmente

(THAKUR, TEWARI & SHARMA, 2014; ASHFAQ, 2015).

As lipases podem ser de origem vegetal, animal e microbiana. Atualmente as lipases microbianas têm sido muito utilizadas nas pesquisas, pois apresentam vantagens de catalisar diversas reações, produzir altos rendimentos, reduzir custos de produção, relativa facilidade de manipulação genética, são estruturalmente estáveis em solventes orgânicos, independem dos cofatores, catalisam reações utilizando uma ampla gama de substratos e possuem alta enantiosseletividade (CARVALHO *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2015; JAVED *et al.*, 2018; ZAITSEV, SAVINA & ZAITSEV, 2019).

Além das lipases, dentre as hidrolases empregadas nos setores, podemos destacar a amilase, celulase, protease e a lipase (MONTEIRO & SILVA, 2009).

A amilase possui interesse industrial e aplicação na indústria alimentícia e de fermentação, farmacêutica, médica, clínica, além de bom agente antibiofilme (SOUZA & MAGALHÃES, 2010; KALPANA *et al.*, 2012, PADMAVATHI *et al.*, 2018).

A celulase é uma enzima com grande valor industrial, ocupando em torno de 20% do mercado mundial de enzimas, com importante função na produção de biocombustível (SRIVASTAVA *et al.*, 2018), indústria de sucos e frutas e, principalmente, na indústria têxtil e de papel e celulose (MONTEIRO & SILVA, 2009).

A protease é a enzima mais utilizada mundialmente nas indústrias e é amplamente aplicada na degradação de proteínas e síntese de peptídeos (YADAV *et al.*, 2015, CHI *et al.*, 2015, OLIVEIRA *et al.*, 2012) e é aplicada na indústria alimentícia e ração animal, indústria de papel e celulose, processamento de couro e indústria farmacêutica (MONTEIRO & SILVA, 2009).

Dentre os fatores econômicos e industriais, a lipase é amplamente utilizada por ser de fácil produção, abundância de microrganismos capazes de sintetizá-la, além da vasta aplicabilidade na indústria alimentícia, têxtil, papel e celulose, farmacêutica, fabricação de detergentes e outros produtos de limpeza, biocombustível e tratamento de efluentes (RODRIGUES *et al.*, 2015).

As lipases são enzimas que pertencem à família  $\alpha/\beta$  hidrolases (KAPOOR & GUPTA, 2012; PRIJI *et al.*, 2014), não precisam de um cofator para sua atividade e permanecem ativas em solventes orgânicos (LEE *et al.*, 2015). O elevado rendimento em meio aquoso e orgânico, o reduzido tempo reacional, a estabilidade frente ao pH e temperatura, altos rendimentos, independem dos cofatores e catalisam reações utilizando uma ampla gama de substratos, sendo

estas, algumas das propriedades que tornam as lipases os biocatalisadores mais utilizados industrialmente (THAKUR, TEWARI & SHARMA, 2014; ASHFAQ, 2015; CARVALHO *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2015; JAVED *et al.*, 2018; ZAITSEV, SAVINA & ZAITSEV, 2019).

As enzimas podem ser produzidas por duas rotas de fermentação, sendo uma em estado sólido (FES) e a outra por estado submerso (FS) (VALENTE *et al.*, 2010).

As enzimas de interesse industrial, como as lipases, podem ser obtidas por FES, por meio do uso de resíduos agroindustriais (substratos de baixo custo) ou suporte de crescimento para os microrganismos, reduzindo assim o custo da produção (MENONCIN *et al.*, 2010) ou por FS, na qual os microrganismos crescem em meio líquido, com alto teor de água livre. Independente do processo de fermentação, a produção de lipases está relacionada à composição do meio de cultivo e condições de fermentação.

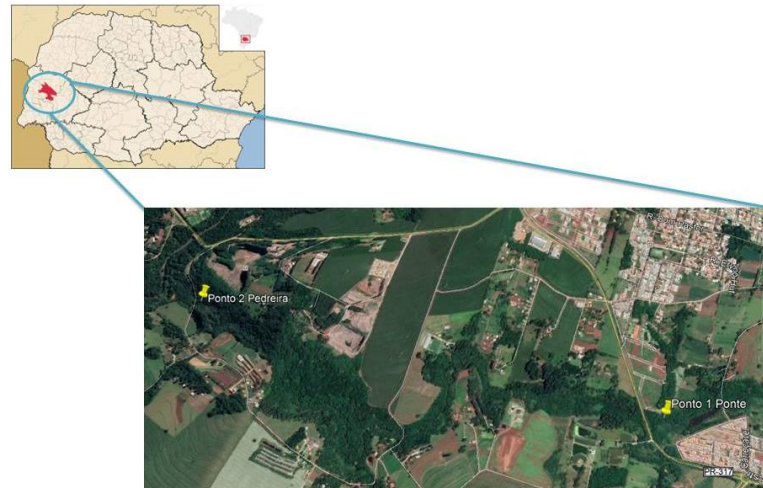
Diante desse contexto, busca-se novas fontes microbianas com potencial enzimático lipolítico que possam ser aplicados no processo de biorremediação de efluentes de laticínios com alta carga de gordura, contribuindo assim, para a diminuição no acúmulo de resíduos poluentes.

Objetiva-se com este trabalho selecionar dentre as 24 leveduras isoladas, aquela que apresenta a maior produção de lipase por Fermentação em Estado Sólido (FES) para ser empregada na biorremediação de efluentes com alta carga de gordura de um laticínio no município de Santa Lúcia – PR.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. PROCEDIMENTOS DE COLETA E ISOLAMENTO DO MICRORGANISMO**

As leveduras foram obtidas através de amostras coletadas no rio Toledo, localizado na cidade de Toledo, Paraná. As coletas foram realizadas em dois pontos, o primeiro foi denominado ponto 1 (ponte) localizado nas coordenadas geográficas 24°45'10.86"S 53°45'3.52"O, em perímetro urbano, próximo ao contorno sul da cidade, tendo pouca atividade agrícola, e o segundo foi denominado ponto 2 (pedreira), na foz do rio com coordenadas geográficas 24°45'14.35"S 53°46'33.91"O, localizado próximo a uma pedreira localizada a 300 metros da foz apresentando uma mata ciliar bem preservada com predomínio de atividade agrícola (Figura 1).



**Figura 1:**Localização geográfica dos pontos de coleta de água para seleção das leveduras no Rio Toledo - PR. (Fonte: Google Earth).

Para a escolha dos pontos houve uma avaliação prévia do local em busca de diferentes condições de impacto antrópico. Em cada ponto foram coletados 200 mL de água em frascos esterilizados com tampa. Os frascos foram submersos a 30 cm da superfície e a uma distância aproximada de 2 metros da margem nos dois pontos. Foram aferidos o pH e temperatura com uma sonda multiparâmetro (AAKER). Após o término do procedimento, os frascos foram acondicionados em caixa térmica com gelo.

Alíquotas de 250  $\mu$ L da amostra foram semeadas por métodos de espalhamento em superfície em placas de Petri com meio YPD (extrato de levedura 1%, glicose 2%, peptona 2%, ágar 2%) suplementado com 0,5% de cloranfenicol e 0,5% de cloridrato de tetraciclina para inibir crescimento bacteriano. As placas já contendo o material inoculado foram incubadas a temperatura de 28°C por 48 horas.

Após o crescimento, para a classificação macroscópica das colônias analisou-se a cor, textura, tamanho, tipo da borda, brilho e formato. As colônias de aspectos leitosos, opacos ou com brilho, de tamanho variando entre 0,5 a 4 mm de diâmetro e de coloração variada são as indicativas de leveduras. Para garantia da pureza da colônia, utilizou-se de coloração Gram para observar se haviam células de colônias mistas, brotos (característica de leveduras), entre outras peculiaridades e posterior análise microscópica onde foram observados, a forma das células e brotamentos.

As colônias selecionadas foram novamente isoladas pela técnica de estriamento em placas em mesmo meio de YPD para obtenção da cultura pura. Cada cultura isolada recebeu a



denominação JC (Jéssyca Carvalho) seguido de uma numeração sequencial, e AAP (Andressa Alves Silva Panatta) seguido de uma numeração sequencial. Após confirmar a pureza, foram mantidos em meio BHI/glicerol (070/30%) e armazenados em freezer a -20°C.

## 2.2. *Screening* DAS LEVEDURAS ISOLADAS

As colônias puras isoladas que apresentaram crescimento em meio YPD foram testadas quanto a sua capacidade de atividade enzimática extracelular para amilase, celulase, protease e lipase pelo método de ensaio em placas.

Para identificar as leveduras produtoras de amilase utilizou-se meio ágar nutriente (NA) (NaCl 0,5%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,2%, extrato de carne 0,3%, glicose 1%, ágar 2%) acrescentando 0,5% de amido solúvel, o meio foi autoclavado por 20 minutos a 121°C. Em seguida, após reativação por 24 horas em meio YPD, as leveduras foram inoculados em dois pontos da placa contendo o meio descrito acima (SONUNE & GARODE, 2018).

As leveduras produtoras de amilases foram reveladas com solução de iodo aquoso (por 5 minutos) e identificadas pela presença de um halo claro ao seu redor, após o descarte da solução, o que indicou a degradação do amido.

Para verificar a atividade da produção de celulase foi utilizado a metodologia modificada de Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) e para tanto empregou-se meio base (MgSO<sub>4</sub> 0,02%, NaCl 0,01%, extrato de levedura 0,04%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,04%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01%) acrescido de 1% de carboximetilcelulose, o qual foi autoclavado por 20 minutos a 121°C.

Na revelação utilizou-se do corante vermelho congo a 0,01%, com o decorrer de 30 minutos o excesso do corante foi retirado e após mais 30 minutos as leveduras secretoras de celulases apresentaram uma coloração vermelho pálido ao redor (RUEGGER & TAUK-TORNISIELO, 2004).

Para as leveduras produtoras de lipases, utilizou-se o meio base (MgSO<sub>4</sub> 0,02%, NaCl 0,01%, extrato de levedura 0,04%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,04%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01%) suplementada de 1% de azeite de oliva extra-virgem (Galo vermelho), 0,001% de corante rodamina B e 0,01% Tween 80. O meio foi autoclavado por 20 minutos a 121°C. As cepas produtoras de lipases foram identificadas pela presença de halo alaranjado fluorescente quando expostas a luz ultravioleta de 366 nm (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Para as leveduras produtoras de proteases, utilizou-se o meio ágar nutriente (NaCl 0,5%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,2%, extrato de carne 0,3%, glicose 1%, ágar 2%)

acrescentando 2% de leite em pó desnatado. O meio ágar nutriente foi autoclavado por 20 minutos a 121°C, já o leite em pó foi autoclavado separado por 5 minutos a 121°C, para que não ocorresse a desnaturação da proteína. Foram observadas zonas claras ao redor das cepas positivas (BEN-GIGIREY *et al.*, 2000).

Em todos os casos, os experimentos foram realizados em triplicatas e incubadas por um período de 96 horas a uma temperatura de 28°C e, só então, reveladas para verificação de halos. O índice enzimático dos isolados foram estimadas mediante a equação (01) da relação entre diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia conforme Ten *et al.*, (2004), medidas com o auxílio de um paquímetro (mm).

$$IE = \frac{\text{DIÂMETRO MÉDIO DO HALO DE DEGRADAÇÃO}}{\text{DIÂMETRO MÉDIO DE CRESCIMENTO MICROBIANO}} \quad \text{Eq. (01)}$$

## 2.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

### 2.3.1. Produção da lipase por FES

A lipase foi produzida por FES utilizando farelo de semente de girassol (*Helianthus annuus*) como substrato. Os ensaios de FES foram realizados conforme metodologia descrita por Rodrigues *et al.* (2015). Para a FES foi realizado um estudo cinético de 168 horas, com 10,0 g de farelo de semente de girassol (*Helianthus annuus*) com granulometrias entre 1,19 mm (16 Mesh) e 2,0 mm (10 Mesh), umidade de 55% (tampão fosfato 50 mM pH 7,0),  $10^8$  esporos por grama, 28°C. Os experimentos foram realizados em triplicatas e todos os materiais e meios de cultura foram autoclavados a 121 °C (15 minutos).

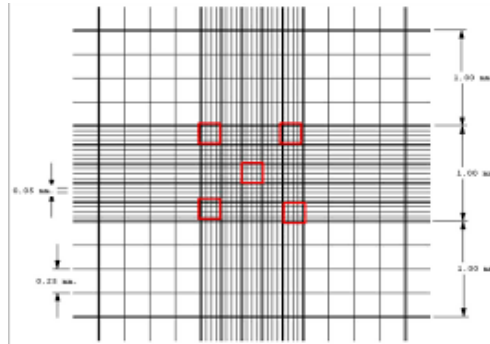
A produção de lipase foi acompanhada pela dosagem da atividade lipolítica pelo método titulométrico no material fermentado (0 a 168 horas), segundo Rodrigues *et al.* (2015). A atividade lipolítica é expressa como unidades de atividade enzimática (U).

A cada 24 horas foram retiradas amostras em triplicata e os sólidos fermentados foram congelados a 0°C por 24 horas para interromper o crescimento das leveduras. Após esse período, foram secos em estufa com circulação de ar (30°C), acondicionados em embalagens plásticas e armazenados na geladeira.

### 2.3.2. Preparo do inóculo

A levedura selecionada foi ressuspensa com uma alçada da linhagem em erlenmeyer de 250 mL contendo caldo YPD + 0,5% cloranfenicol e acondicionado em estufa a 30°C por

24 horas, após esse período foi inoculado 1,5 mL do caldo contendo  $10^8$  de células. A concentração necessária foi obtida através da contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico seguindo o método de Florencio (2011) conforme Figura 2.



**Figura 2:** Câmara de Neubauer usada para contagem das células. (Fonte: Embrapa)

O volume das células foi calculado pela equação (02):

$$V_{\text{inóculo}} = ms \times C \times (F \times V_{\text{cam}} \times M)^{-1} \quad \text{Eq.(02)}$$

Onde:

$V_{\text{inóculo}}$  = volume inóculo a ser adicionado (mL)

ms = massa do substrato usado na FES (g)

C = concentração inicial de células

F = fator de diluição;

$V_{\text{cam}}$  = volume total da câmara  $25 \times 10^4$  mL

M = média da contagem de 5 quadrantes ( $n$  células  $\text{mL}^{-1}$ ).

### 2.3.3. Determinação da Atividade Lipolítica

Para titulação da atividade lipolítica foi utilizado o método de Rodrigues *et al.* (2015), com modificações. Adicionou-se em erlenmeyers, 1 grama do material fermentado e 20 mL do meio reacional (solução tampão fosfato 50 mM pH 7, 10% goma arábica e 1,0 mM de azeite de oliva-Galo vermelho). Agitou-se em *shaker* a  $37^\circ\text{C}$  por 20 minutos para liberação dos ácidos graxos livres, após esse período, foi adicionado 20 mL da solução etanol/acetona nas amostras para interromper a reação (desnaturação da enzima). Os ácidos graxos liberados foram titulados com NaOH (0,05 M).

Para determinação da atividade enzimática ( $\text{U gss}^{-1}$ ) utilizou-se da metodologia de Rabelo (2010) com modificações da seguinte equação (03):

$$A1 = \frac{\Delta V \cdot C_{\text{NaOH}} \cdot f_c \cdot 60 \text{ s}}{\Delta t \quad 1000 \text{ mL} \times 1 \text{ min}} \quad \text{Eq (03)}$$

Onde:

$\Delta V$  =  $V_m$  (volume médio) –  $V_b$  (volume branco)

$C_{\text{NaOH}}$  = concentração de NaOH (mM)

$f_c$  = fator da solução de NaOH

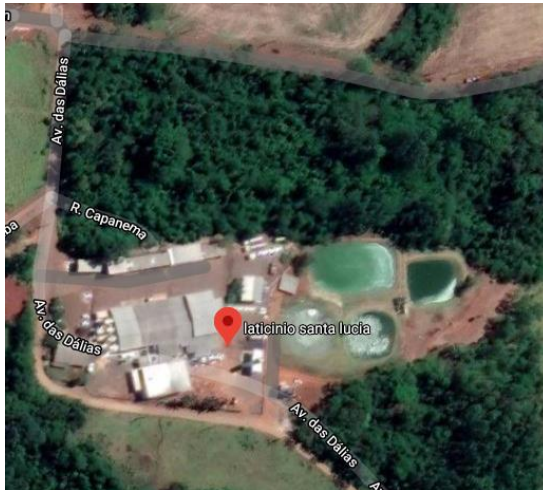
$\Delta t$  = Tempo da reação em segundos

#### 2.4. CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

O efluente utilizado neste estudo foi cedido por uma indústria de laticínios do município de Santa Lúcia-PR (25°24'25"S 53°33'57"O). A amostra do efluente foi coletada na entrada do tratamento de efluentes, onde sua composição é de origem da produção e limpeza da indústria.

Os principais produtos desta empresa são queijo muçarela, prato, provolone, minas frescal, colonial, parmesão, queijo zero lactose e nata. O sistema de tratamento de efluentes da empresa, que recebe todo o efluente gerado nos processos industriais e limpeza, consiste em uma etapa preliminar de peneiramento para remoção de sólidos grosseiros seguida do tratamento biológico e decantação.





**Figura 3:** Localização geográfica do ponto de coleta do efluente do laticínio de Santa Lúcia - PR. (Fonte: Google Earth).

O efluente foi coletado em um único ponto, no primeiro reservatório onde ocorre a entrada do efluente para tratamento. Foram coletados 20 litros de efluente em um recipiente estéril com tampa. A amostra foi transportada para o Laboratório de Microbiologia e Bioquímica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo-PR.

## 2.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO – QUÍMICA DO EFLUENTE

Para a caracterização físico-química do efluente e tratado por biorremediação, foram feitas análises quanto aos parâmetros de demanda química de oxigênio (DQO); pH; turbidez e determinação de óleos e graxas totais (O&G) (APHA, 2012).

## 2.6. CINÉTICA DA BIORREMEDIAÇÃO

Para os estudos de biorremediação foram utilizados o sólido fermentado contendo a lipase por adição direta.

Nestes experimentos a enzima foi produzida nas melhores condições por FES, com o farelo de semente de girassol, realizada com 55 % de umidade, granulometria entre 1,19 mm (16 Mesh) e 2,0 mm (10 Mesh) e  $10^8$  células.

Nos ensaios de biorremediação utilizou-se 22 g do sólido fermentado (111,10 U) em 1000 mL do efluente de laticínio, sendo que os experimentos foram realizados em duplicata. A cinética de biorremediação foi observada até 168 horas, retirando-se amostras a cada 24 horas. As reações de biorremediação foram realizadas em *shaker*, 150 rpm e 37 °C, com objetivo de

reduzir óleos e graxas (O&G). Para cada ponto determinaram-se os valores de óleos e graxas totais, segundo a metodologia de APHA (2012) método 5520D.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. *Screening* DE LINHAGENS DE LEVEDURAS

O *screening* em meio sólido, contendo diferentes fontes de carbono como substratos, revelaram o potencial das leveduras testadas em produzir e secretar enzimas hidrolíticas, sendo que todas as 24 leveduras testadas apresentaram atividade em pelo menos uma das fontes de carbono testadas.

Na Tabela 1 observa-se o índice enzimático (IE) dos isolados selecionados como os melhores produtores de amilase, celulase, protease e lipase.

**Tabela 1.** Índice Enzimático para as enzimas lipases, celulases, amilases e proteases produzidas por leveduras isoladas do rio Toledo.

Levedura (código)	Identificação da espécie	Índice Enzimático (IE)			
		Lipase	Celulase	Amilase	Protease
AAP194	<i>Candida palmioleophila</i>	0,5	1,4	0,6	-
AAP196	<i>Candida palmioleophila</i>	1,2	0,6	-	1,0
AAP199	<i>Candida palmioleophila</i>	0,7	1,4	0,6	-
AAP322	<i>Candida palmioleophila</i>	0,6	0,3	0,5	-
AAP358	<i>Candida palmioleophila</i>	1,0	2,2	-	0,8
AAP361	<i>Candida palmioleophila</i>	0,6	0,3	-	1,0
AAP374	<i>Candida palmioleophila</i>	0,9	-	-	-
AAP392	<i>Candida palmioleophila</i>	0,6	0,2	1,0	-
AAP395	<i>Candida palmioleophila</i>	0,6	1,3	-	0,7
AAP495	<i>Candida palmioleophila</i>	-	1,3	-	-
AAP515	<i>Candida palmioleophila</i>	0,9	1,1	-	0,8
AAP533	<i>Candida palmioleophila</i>	0,6	0,4	0,6	-
AAP088	<i>Candida glabrata</i>	0,7	0,4	0,6	-
AAP103	<i>Candida glabrata</i>	1,1	1,3	-	0,6
AAP171	<i>Candida glabrata</i>	-	0,3	-	0,8

AAP175 <i>Candida glabrata</i>	0,7	1,4	-	1,0
AAP459 <i>Candida glabrata</i>	1,1	0,3	-	0,8
AAP490 <i>Candida glabrata</i>	0,6	0,5	0,8	0,9
AAP135 <i>Candida krusei</i>	1,1	1,0	0,7	-
AAP132 <i>Candida krusei</i>	-	1,2	0,6	0,4
AAP435 <i>Candida krusei</i>	-	0,6	-	0,9
AAP462 <i>Candida krusei</i>	0,5	0,6	-	1,1
JC072 <i>Apiotrichum mycotoxinivorans</i>	0,8	1,4	0,6	0,7
JC074 <i>Apiotrichum mycotoxinivorans</i>	2,3	1,3	1,7	1,6

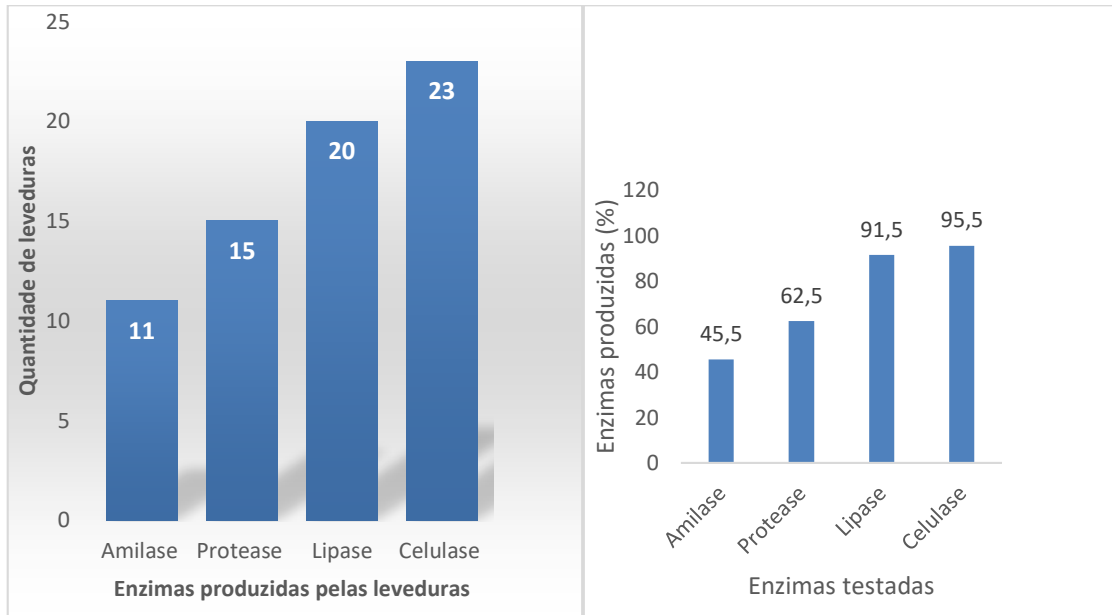
A atividade enzimática dos isolados foi estimada mediante a relação entre diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia. O diâmetro do halo de hidrólise é considerado um parâmetro para auxiliar de maneira qualitativa na seleção das linhagens com maior índice de degradação, sendo considerado uma medida mais rápida e simples. Segundo Ten *et al.* 2004, são considerados bons produtores enzimáticos para aplicação industrial as leveduras que apresentaram “IE”  $\geq 2,0$ , porém, neste caso consideramos alguns indivíduos que ficaram próximos a esse valor.

Para a identificação genética da levedura selecionada, foi extraído o DNA internamente, seguindo o procedimento descrito por Brandão *et al.*, caracterizadas por impressões digitais de DNA, obtidas pela metodologia de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando o primer microsatélite (GTG)<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3').

A identificação da levedura foi confirmada por amplificação com os iniciadores NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG'3) e NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG'3), que se liga nos domínios D1-D2 na região 26S, que é um gene conservado usado para identificar espécie (BRANDÃO *et al.*, 2011).

As amostras denominadas JC072 e JC074 foram identificadas como *Apiotrichum mycotoxinivorans*. Essa espécie era enquadrada no gênero *Trichosporon* e foi descrito pela primeira vez em 2004 (DE ALMEIDA *et al.*, 2017).

Nas Figuras 4A e B, estão demonstradas as principais enzimas hidrolíticas isoladas e as suas porcentagens.



**Figura 4A:** Quantidade de enzimas e **B-** Porcentagem de lipases, celulases, amilases e proteases produzidas de leveduras isoladas do rio Toledo localizadas no município de Toledo-PR.

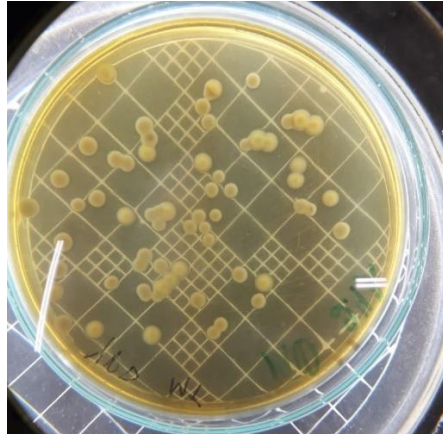
Das leveduras avaliadas, 22 linhagens não apresentaram atividade enzimática para pelo menos uma das enzimas testadas (amilase, celulase, lipase e protease). A ausência de atividade enzimática, de acordo com Vasconcelos *et al.* (2003), pode ser atribuída à incapacidade de secreção pelas linhagens testadas, ao direcionamento da produção para o metabolismo intracelular ou pela sensibilidade dos métodos de detecção utilizados.

### 3.2. PRODUÇÃO DE LIPASES PELA LEVEDURA *Apiotrichum mycotoxinivorans*

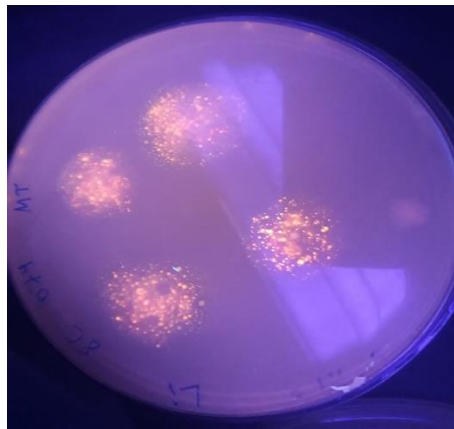
Devido a sua grande versatilidade, a lipase foi selecionada para dar sequência as pesquisas pois apresentam um futuro promissor e têm sido empregadas em inúmeras atividades industriais, desde aditivos em detergentes até síntese de compostos orgânicos e biorremediação, podendo ser utilizadas em diversos tipos de substratos (HASAN, SHAH & HAMEED, 2006, PATEL *et al.*, 2017).

O microrganismo denominado JC074 (*Apiotrichum mycotoxinivorans*) foi utilizado na FES por apresentar um IE de 2,3 que de acordo com Lealem e Gashe (1994), foi considerado o mais viável, conforme ilustrado nas Figuras 5 e 6.





**Figura 5:** Linhagem *Apiotrichum mycotoxinivorans* inoculada em meio YPD e cloridrato de tetraciclina (500 mg L<sup>-1</sup>), incubada por 48 horas a 28°C.



**Figura 6:** Imagem da câmara de UV. Produção de fluorescência da levedura *Apiotrichum mycotoxinivorans*. (Fonte: próprio autor, 2021).

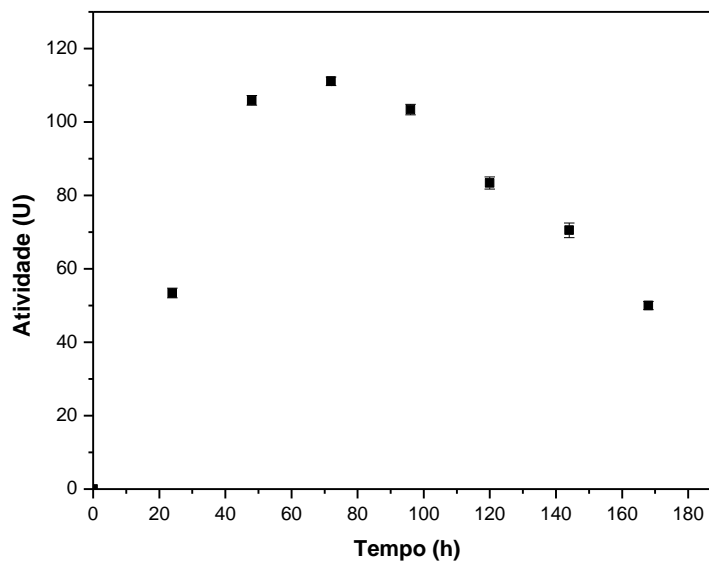
A produção de lipase em placas de Petri pela levedura *Apiotrichum mycotoxinivorans* foi confirmada pela presença de halos alaranjados, fluorescentes ao UV, após 48 horas de incubação em estufa, a 28 °C (Figura 6). A lipase produzida pela levedura JC074 apresentou um índice enzimático (IE) de 2,3, calculado segundo a equação 01. A atividade enzimática foi estimada mediante relação entre diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia. O diâmetro do halo de hidrólise é considerado um parâmetro para auxiliar na seleção das linhagens com maior índice de degradação, sendo considerado uma medida mais rápida e simples (TEN *et al.*, 2004).

Diante disso, foi considerado que o microrganismo é bom produtor enzimático para aplicação industrial e biorremediação quando “IE”  $\geq$  2,0. Após realizados estes testes

preliminares, a linhagem da levedura foi utilizada para a produção de lipase por FES, segundo Rodrigues *et al.* (2015).

### 3.3. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA ENZIMA

Nos estudos prévios avaliou-se a cinética de produção de lipases de JC074 (*Apiotrichum mycotoxinivorans*), utilizando-se a semente de girassol como substrato, durante 168 h de fermentação, a 27 °C, 55 % de umidade e granulometria entre 1,19 mm (16 Mesh) e 2,0 mm (10 Mesh) e  $10^8$  células do substrato. Os experimentos foram realizados em duplicata. Os valores de atividade lipolítica foram obtidos pelo método titulométrico. Os resultados são apresentados na Figura 7.



**Figura 7:** Cinética de produção de lipase fúngica de *Apiotrichum mycotoxinivorans* por FES. Os ensaios foram realizados com umidade de 55 %. Experimentos realizados em duplicata com temperatura de 27°C.

Os resultados mostraram que inicialmente houve um aumento de atividade lipolítica com o tempo de fermentação (Figura 7), devido ao maior crescimento do microrganismo por maior disponibilidade de substrato. A maior atividade lipolítica (111,10 U ou 11,1 U gss<sup>-1</sup>) foi obtida após 72 horas de fermentação. A redução ocorreu de forma gradativa após o período de 72 horas, onde a queda foi de 25 % em 120 h e 45 % em 168 horas.

Após o tempo de 72 horas, nota-se uma diminuição dos valores de atividade lipolítica, provavelmente devido à diminuição da fonte de carbono dos óleos presentes no substrato, levando a morte do microrganismo. A queda na atividade lipolítica também ocorre porque o fungo começa a produzir proteases para processar as outras fontes de carbono menos abundantes. Essas proteases são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas presentes em proteínas e outras enzimas, desnaturando e diminuindo a concentração de lipases (OLIVEIRA, 2013; KANMANI *et al.*, 2014).

Amorim, *et al.* (2012) utilizaram o fungo *Aspergillus niger* e farelo de cacau como substrato para a FES e obtiveram um pico máximo de atividade lipolítica de 11,67 U gss<sup>-1</sup> em 72 horas. Utilizando o mesmo microrganismo, mas farelo de trigo como substrato, Falony *et al.* (2006) obtiveram um pico enzimático de 9,14 U gss<sup>-1</sup> no mesmo período de 72 horas. Moura (2020), utilizou a lipase isolada do fungo filamentosso JC2017, obteve pico máximo de produção em 96 horas de fermentação (21,02 U gss<sup>-1</sup>). Estes valores estão próximos aos obtido neste trabalho.

#### 4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICO DO EFLUENTE

A coleta foi realizada no ponto de entrada do sistema de tratamento, onde o efluente é considerado bruto. As amostras apresentaram uma coloração esbranquiçada e aspecto bastante oleoso, característico de indústrias de laticínios. A fim de caracterizar de forma físico-químico o efluente gerado pela empresa, foram realizadas análises laboratoriais. Seguindo os parâmetros de coleta, transporte e acondicionamento de amostras segundo a NBR 9898 (1987).

Os resultados obtidos na caracterização do efluente bruto de indústria de laticínio são descritos na Tabela 2.

**Tabela 2-** Caracterização inicial do efluente bruto de indústria de laticínio.

Parâmetros	Unidades	Valor Médio	Padrão Conama
Óleos e graxas	mg L <sup>-1</sup>	1424,5 ± 26,51	50,0
pH	-----	9,67 ± 0,035	5,0-9,0
Turbidez	NTU	637 ± 2,64	-----
DQO	mg de O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	1063,01 ± 18,04	-----

<b>DBO</b>	mg de O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	514,87 ± 38,54	-----
------------	--------------------------------------	----------------	-------

**Legenda:** pH (potencial hidrogeniônico); DQO (demanda química de oxigênio); DBO (demanda bioquímica de oxigênio).

O Potencial Hidrogeniônico (pH) é um fator que influencia diretamente no crescimento microbiológico, sendo recomendado que o pH esteja dentro de uma faixa de 5,0 a 9,0 para que não seja tóxico aos microrganismos. Sendo assim o pH apresentou-se acima dos parâmetros estabelecidos pela resolução CONAMA nº 430\2011, sendo necessária a sua correção.

A Demanda Química de Oxigênio (DQO) é um dos parâmetros mais importantes para a determinação do grau de poluição da água. Ela engloba tanto a necessidade de oxigênio para degradar matéria orgânica biodegradável quanto matéria orgânica formada por processos químicos. Valores altos podem acarretar em diversos prejuízos, estando muito acima dos valores permitidos de lançamento. Entretanto altos teores para os parâmetros citados são comuns em efluentes brutos de laticínios devido à grande quantidade de matéria orgânica do processo produtivo. Neste caso, necessita de correção, pois apresentou elevado nível de DQO. A DQO é de extrema importância na escolha do sistema de tratamento, afim de se definir se determinado efluente requer tratamento físico-químico ou biológico (NUNES, 2004).

Outro parâmetro indispensável nos estudos de caracterização de efluentes de laticínios é a DBO, que normalmente é considerada como quantidade de oxigênio consumido durante um determinado período de tempo (5 dias), a temperatura de incubação específica (20°C), por isso DBO<sup>5,20</sup>. Os maiores aumentos em termos de DBO, num corpo d'água, são provocados por despejos de origem predominantemente orgânica (CETESB, 2001).

Em relação à biodegradabilidade, os parâmetros analisados indicam que o efluente de laticínios estudado possui um perfil direcionado ao tratamento biológico devido a sua razão DQO/DBO ser de 2,06, estando, portanto, abaixo de 2,5. Caso a relação DQO/DBO esteja com seu valor entre 5 e 2,5, haverá necessidade de se tomar cuidado quanto a escolha do tratamento biológico, a fim de que seja removida a quantidade de matéria que se deseja. Estando essa relação com um valor  $\geq 5$ , as chances de remoção são mínimas (JARDIM & CANELA, 2004).

O parâmetro Óleos & Graxas (O&G) se encontra acima dos limites estabelecidos para lançamento, sendo um resultado comum para o efluente bruto deste tipo de empreendimento. Quando lançado nos corpos hídricos pode causar inibição no crescimento e desenvolvimento de microrganismos sendo extremamente prejudicial.

A Turbidez não possui limite de lançamento e tem seu alto valor relacionado a alta presença de sólidos em suspensão, o que impede a passagem de luz solar prejudicando o desenvolvimento da vida aquática.

Nem todos os efluentes possuem necessidade de caracterização do parâmetro de óleos e graxas (O&G), porém, por se tratar de uma indústria de laticínios, e por sua matéria prima principal ser o leite, o conhecimento deste parâmetro torna-se importante, uma vez que contribui para o aumento da matéria orgânica, deixando o efluente mais difícil de ser degradado, uma vez que a molécula de lipídeo é uma molécula maior.

A Tabela 3 compara os resultados da caracterização físico-química de efluentes de laticínio, encontrados em literatura, com este trabalho.

**Tabela 3** – Resumo comparativo da caracterização físico-químico de efluente de laticínio.

<b>Parâmetros</b>	<b>Efluente em estudo</b>	<b>Silva (2006)</b>	<b>Felippe (2009)</b>	<b>Andrade (2011)</b>	<b>Moura (2020)</b>
<b>DQO</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	1.063	3.567	3.552	4.575	3.163
<b>pH</b>	9,6	8,7	5,4	8,4	5,6
<b>O&amp;G</b> (mg L <sup>-1</sup> )	1.424	414	517	ND	2.517
<b>Turbidez</b>	637	ND	ND	ND	ND

**Legenda:** ND: não detectável pelo método empregado, pH (potencial hidrogeniônico); DQO (demanda química de oxigênio); O&G (óleos e graxas).

Percebe-se que alguns parâmetros (pH e O&G) do efluente estudado apresenta-se acima dos valores citados na literatura. Porém, por serem efluentes oriundos de laticínios, com características semelhantes em sua composição, podemos seguir o mesmo caminho por eles percorridos para a biorremediação, sendo que, na maioria deles, apresenta como sistema as lagoas de estabilização antecipados por alguns tratamentos preliminares e primários.

## 5. CINÉTICA DA BIORREMEDIAÇÃO

Os valores obtidos na caracterização do efluente de laticínio, após o processo de biorremediação, estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4-** Caracterização do efluente de laticínio após o processo de biorremediação.

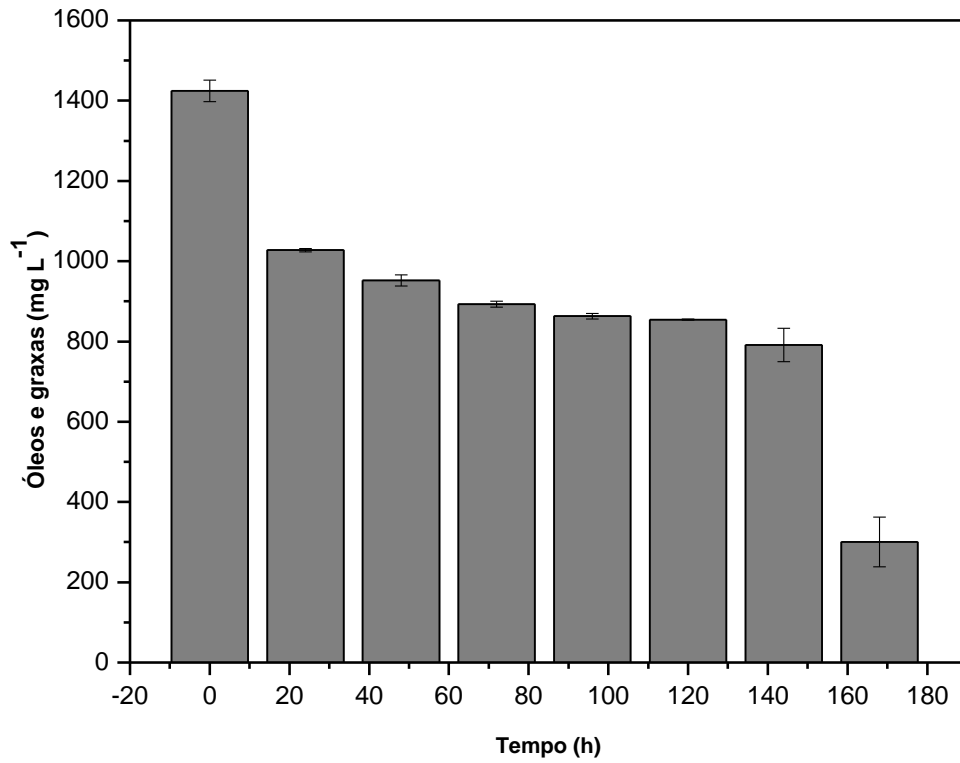
Parâmetros	Unidades	Valor Médio
Óleos e graxas	mg L <sup>-1</sup>	300 ± 61,87
pH	-----	7,58 ± 0,577
Turbidez	NTU	1564,33 ± 7,23
DQO	mg de O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	690,95 ± 11,72
DBO	mg de O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	334,66± 24,99

**Legenda:** pH (potencial hidrogeniônico); DQO (demanda química de oxigênio), DBO (demanda bioquímica de oxigênio).

Os resultados demonstraram que houve uma redução satisfatória de O&G, pH, DQO e DBO, sendo que, a turbidez apresentou aumento durante o processo de biorremediação. Diante dos resultados apresentados, necessita-se que seja analisado outros parâmetros de controle, seja químico ou biológico para o ajuste que atenda o monitoramento estabelecido pela legislação ambiental.

Os efluentes industriais gerados em frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral possuem elevados teores de demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO), tendo em vista que o conteúdo de gorduras aumenta a concentração de matéria orgânica. Neste contexto, processos alternativos que visam à recuperação ou diminuição da carga de gorduras de efluentes são de interesse para a indústria. Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases reduz o teor de lipídios, o diâmetro das partículas de gorduras em até 60% e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização (CASTRO, MENDES & SANTOS, 2004).

Com relação aos experimentos de biorremediação, o parâmetro, óleos e graxas (O&G), que é o objetivo deste trabalho, demonstrou o comportamento observado pela Figura 8.



**Figura 8-** Cinética de biorremediação enzimática de Óleos e Graxas (O&G) do efluente de laticínio.

Para o parâmetro óleos e graxas (O&G), percebe-se uma concentração elevada em razão da grande quantidade de gordura animal presente no efluente bruto oriunda do processo produtivo. Este, por sua vez, apresenta ( $1424,5 \pm 26,51 \text{ mg L}^{-1}$ ), estando assim muito acima dos padrões estabelecidos em legislações, como pode ser visualizado na Figura 8. Ao final de 168 horas de biorremediação, a concentração de óleos e graxas foi de ( $300 \pm 61,87 \text{ mg L}^{-1}$ ), uma redução de 79%.

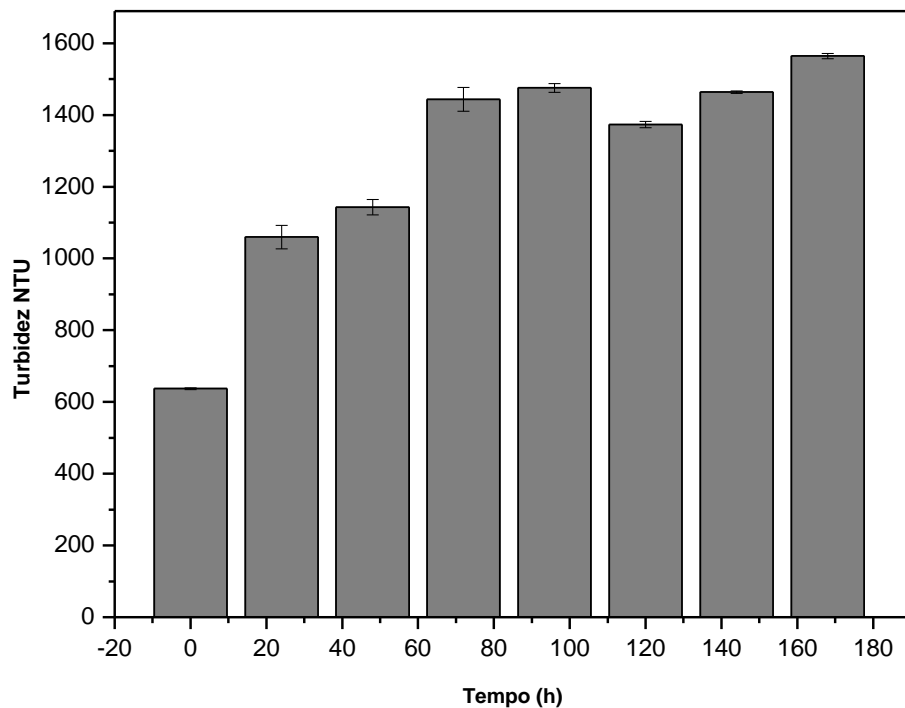
Dharmsthiti *et al* (1988) utilizaram enzimas lipolíticas de *Pseudomonas aeruginosa* LP602, na biorremediação de águas residuais com elevado teor de lipídios. Os autores verificaram uma redução na concentração abaixo de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  e a fração de lipídios reduziu 70% em 24 horas.

Rigo (2004), utilizou a lipase obtida de microrganismo por fermentação sólida em biorremediação de efluentes com alta carga de gorduras, obtendo boas conversões em ácidos graxos livres ( $101,29 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1}$ ) em  $27^{\circ}\text{C}$ , após 15 horas.

Moura (2020), utilizou a lipase isolada do fungo filamentososo JC2017, na biorremediação de efluente de laticínio e obteve uma redução de 91,6 % de óleos e graxas no efluente de laticínio utilizado.

A biorremediação enzimática surge como um instrumento de estímulo para o desenvolvimento de uma nova tecnologia capaz de garantir economia na manutenção e tratamento, proporcionando resultados que garantam uma melhoria na qualidade da água residual, que poderá se reutilizar em diversos procedimentos, bem como o seu descarte diretamente nos leitos dos rios, atendendo aos padrões normativos, de forma a não prejudicar a biota do local onde será disposto, garantindo assim a redução do impacto ambiental.

Na Figura 9 está representado o parâmetro turbidez, realizado durante o processo de biorremediação enzimática.



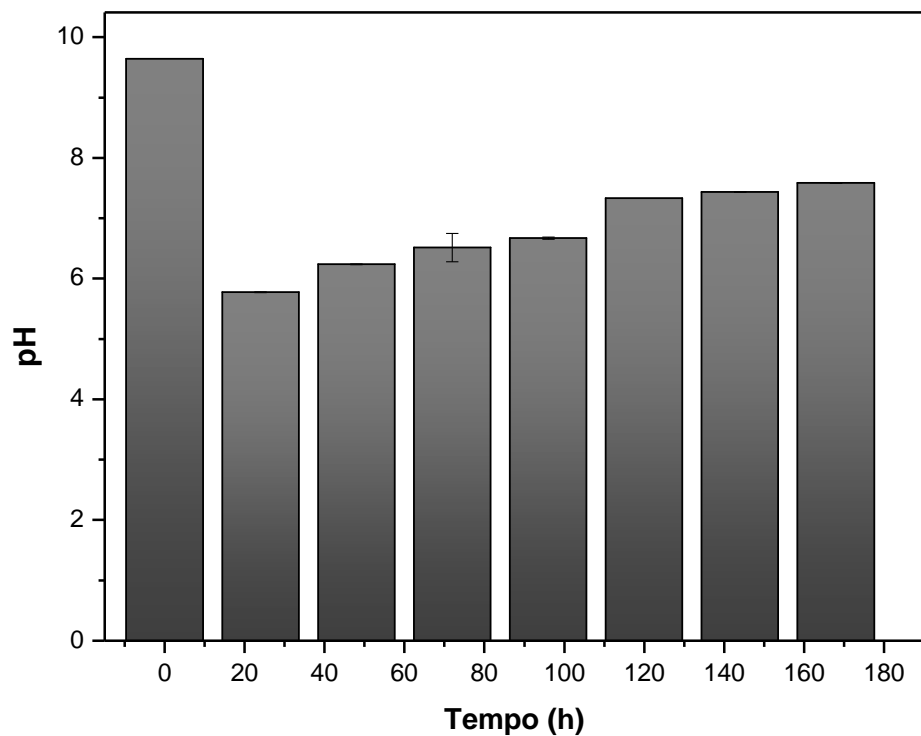
**Figura 9** – Resultado da variação obtido no processo de biorremediação enzimática de turbidez do efluente de laticínio.

Para o parâmetro turbidez, no ponto de coleta efluente bruto, estava em um nível médio de  $(637 \pm 2,64 \text{ NTU})$ , porém após o processo de biorremediação houve uma expressiva elevação



para  $(1564,33 \pm 7,23 \text{ NTU})$  conforme a Figura 9. Isso ocorreu devido ao modo de acondicionamento do substrato fermentado contendo a enzima, no momento da biorremediação do efluente, onde pode-se observar mudança rápida na turbidez, devido a liberação de grande quantidade de sólidos em suspensão com a enzima lipolítica.

Na Figura 10 está representado a variação do pH durante o processo de biorremediação enzimática do efluente.



**Figura 10** – Resultado da variação no processo da biorremediação enzimática do pH de efluente de laticínio.

Tendo em vista que o pH obtido na caracterização do efluente bruto foi de 9,4 e durante a biorremediação houve uma redução gradativa,  $(7,59 \pm 5,77)$  atingindo 80,7% em 168 horas. Portanto, os valores obtidos estão dentro dos parâmetros da legislação do CONAMA, que é de um pH entre 5,0 e 9,0, para o lançamento direto nos corpos receptores. Apesar da redução de óleos e graxas, pH, DQO e DBO, e o processo de biorremediação ser elevada, os resultados obtidos neste estudo ainda não estão de acordo com os valores do CONAMA 2011, sendo

necessária uma redução de 98% de óleos e graxas para atingir os valores da resolução do CONAMA.

## 6. CONCLUSÃO

Conclui-se com este estudo, que as 24 leveduras isoladas do rio Toledo, possuem capacidade de secretar enzimas hidrolíticas como amilase, protease, celulase e lipase, sendo que alguns demonstraram capacidade de secretar dois a três tipos das enzimas hidrolíticas testadas.

No teste qualitativo de *screening* para as quatro enzimas hidrolíticas testadas, a que apresentou melhor índice enzimático foi a lipase, escolhida para os testes quantitativos.

Verificou-se que a levedura *Apiotrichum mycotoxinivorans*, isolada do rio Toledo-PR, produziu lipase por Fermentação em Estado Sólido (FES), com pico máximo de produção em 72 horas (111,10 U).

A lipase produzida por FES foi eficiente no processo de redução de óleos e graxas, com uma redução de 79 % no efluente de laticínio.

A DQO e DBO tiveram uma redução de 65% favorecendo assim a degradação da matéria orgânica presente no sistema. Em relação à biodegradabilidade, a razão DQO/DBO foi de 2,06 indicando que o efluente de laticínios estudado possui um perfil direcionado ao tratamento biológico. O pH teve uma redução de 80,9%, ficando assim dentro das normas do CONAMA.

Os resultados atingidos no tratamento prévio de efluentes de laticínios, com enzima lipolítica imobilizada no sólido fermentado e aplicada diretamente no sistema demonstrou eficácia, mas faz-se necessário na sequência tratamentos posteriores para fins de lançamentos, como a floculação/coagulação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos De Interesse: Aplicações Biotecnológicas. Fungi of Interest: Biotechnological Applications. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, p. 55–59, 2015.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 22nd edition. Edited by RICE, E.W.; BAIRD, R.B.; EATON, A.D. AND CLESCERI, L.S. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF), Washington, D.C., USA, 2012.

ASHFAQ, M. Basmati–Rice a Class Apart (A review). **Rice Research: Open Access**, v. 03, n. 04, p.1-8, 2015.

BEN-GIGIREY, B. et al. Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 8, p. 933-939, 2000.

BEN-GIGIREY, B.; VIEITES BAPTISTA DE SOUSA, J. M.; VILLA, T. G.; BARROS-VELAZQUEZ, J. Characterization of biogenic amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, n. 1–2, p. 19–31, 2000.

BRANDÃO LR, LIBKIND D, VAZ AB, ESPÍRITO SANTO LC, MOLINÉ M, DE GARCÍA V, VAN BROOCK M, ROSA CA. Leveduras de um lago oligotrófico na Patagônia (Argentina): diversidade, distribuição e síntese de compostos fotoprotetores e enzimas extracelulares. **FEMS Microbiol. Ecol.**, 76, p. 1-13, 2011.

BRANDÃO, L. R.; LIBKIND, D.; VAZ, A. B. M.; ESPÍRITO SANTO, L. C.; MOLINÉ, M.; GARCIA, V.; BROOK, M. V.; ROSA, C.A. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): Diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 1, p. 1–13, 2011.

CARVALHO, A et al. Recent Advances in Lipase-Mediated Preparation of Pharmaceuticals and Their Intermediates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 29682-29716, 2015.

CASTIGLIONI, G. L.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32 (2): 292-295. 2009.

- CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- CETESB. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo / Dorothy C. P. Casarini [et al.]. - - São Paulo: **CETESB**, 2001.
- CHI, C.-F., Wang, B., Wang, Y.-M., Zhang, B. e Deng, S.-G. (2015). Isolamento e caracterização de três peptídeos antioxidantes do hidrolisado protéico de cabeças de jaqueta de couro de atum rabilho (*Navodon septentrionalis*). **J. Funct. Foods** 12, 1–10, 2015.
- DE ALMEIDA JUNIOR, J. N.; FRANCISCO, E. C.; DE ANDRADE BARBERINO, M. G. M.; SILVA FILHO, L. V. R. F.; BRANDÃO O, M.; COLOMBO, A., L; PADOVAN, A C. B. Emergence of *Trichosporon mycotoxinivorans* (*Apiotrichum mycotoxinivorans*) invasive infections in Latin America. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 10, p. 719–722, 2017.
- FLORENCIO, C. **Microrganismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de *Trichoderma spp.*** 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- FRANCISCO, MICHELE RODRIGUES. **Seleção e identificação de *Trichoderma, spp.* e potencial para produção de enzimas industriais.** Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia do Rio de Janeiro, 2016.
- GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, v. 46, n. 2, p. 119–126, 2005.
- HASAN, F; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- JARDIM, W.F.; CANELA, M.C. Fundamentos da oxidação química no tratamento de efluentes e remediação de solos. **Caderno temático** v. 01, p. 2-3. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de química, Laboratório de química ambiental, jun 2004.
- JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23-34, 2018.
- KALPANA, B. J.; S. Aarthi, S. Karuthapandian, **Appl. Biochem. Biotechnol.** 167(6) (2012) 1778-94. 2012.
- KANMANI, P.; ARAVIND, J.; KUMARESAN, K. An insight into microbial lipases and their environmental facet. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 3, p. 1147-1162, 2014.

- KAPOOR, M.; GUPTA, M.N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p.555-569, 2012.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 348-352, 1994.
- LEE, L.P.; KARBUL, H.M.; CITARTAN, M.; GOPINATH, S.C.B. Lipase-Secreting Bacillus Species in an Oil-Contaminated Habitat: Promising Strains to Alleviate Oil Pollution. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-9, 2015.
- MEDEIROS, A. O.; MISSAGIA, B. S.; BRANDÃO, L. R.; CALLISTO, M.; BARBOSA, A. R. Water Quality and Diversity of Yeasts From Tropical Lakes and Rivers From the Rio. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1582–1594, 2012.
- MENDES, A. A.; DE OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. D. L. C. Application of chitosan as support for immobilization of enzymes of industrial interest. **Quimica Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.
- MENONCIN, S.D.; DOMINGUES, N.M.; FREIRE, D.M.G.; TONIAZZO, G. Study of the Extraction, Concentration, and Partial Characterization of Lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using Solid-State Fermentation of Soybean Bran. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 537-544, 2010.
- MONTEIRO, V. N., & SILVA, R. do N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, 3(5), 9-23, 2009.
- MOURA, N. F. et al. Variabilidade entre procedências e progênies de Pequizero (*Caryocar brasiliense Camb.*) **Revista Scientia Forestalis**, v. 41, n. 97, p.103-112, 2013.
- OLIVEIRA, A. C. D.; WATANABE, F. M. F.; VARGAS, J. V. C.; MARIANO, A. B.; RODRIGUES, M. L. F. Comparação entre três bioprocessos para a produção de agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 2, p. 822–831, 2012.
- OLIVEIRA, A.C.D.; WATANABE, F.M.; RODRIGUES, M.L.F.; VARGAS, J.V.C.; MARIANO, A.B. Lipase production by endophytic yeast through factorial design. **Academia Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 1, p. 16–21, 2013.
- PADMAVATHI, T.; BHARGAVI, R.; PRIYANKA, P. R.; NIRANJAN, N. R.; PAVITRA, P. V. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 357–362, 2018. Academy of Scientific Research & Technology, 2018.

- PALMA, M. B.; PINTO, A. L.; GOMBERT, A. K.; SEITZ, K. H.; KIVATINITZ, S. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86: 1137-1145, 2000.
- PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. Chapter 2. *Biotechnology of Microbial Enzymes*. 2017.
- PRIJI, P.; UNNI, K.N.; SREEDHARAN, S.; BINOD, P.; BENJAMIN, S. Production, optimization, and partial purification of lipase from *Pseudomonas* sp. strain BUP6, a novel rumen bacterium characterized from Malabari goat. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 71-78, 2014.
- RODRIGUES, M.L.F.; DA SILVA, E.A.; BORBA, C.E., OLIVEIRA, A.C.D.; KRUGER, C.; RAIMUNDO, R. W.; SILVA, L.P.; VANZIN, M.; STUANI, B.T. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium* sp. Isolado das folhas de *Ricinus communis* L. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.4, p. 129- 145, 2015.
- RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO SÂMIA M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de. **Brasil Botanica**, v. 27, n. 2, p. 205–211, 2004.
- SILVA, C. H. D. Fungos associados a invertebrados marinhos: isolamento, seleção e avaliação da produção de enzimas celulolíticas.. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – **Instituto de Ciências Biomédicas**, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.
- SONUNE, N.; GARODE, A. Isolation, characterization and identification of extracellular enzyme producer *Bacillus licheniformis* from municipal wastewater and evaluation of their biodegradability. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 37–44, 2018.
- SOUZA, P. M; DE OLIVEIRA E MEGALHAES, P. Application of Microbial -Amylase in Industry. **Review. Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850–861, 2010.
- SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K.; MOLINA, G. RODRIGUES-COUTO, S.; MANIKANTA, P. W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. September 2017, p. 2379–2386, 2018.
- SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K.; MOLINA, G. RODRIGUEZ-COUTO, S.; MANIKANTA, A.; RAMTEKI, P.W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. 2017, p. 2379–2386, 2018.

- TEN, L. N.; TAEK, I. W.; KYUM, K. M.; SUK, K. M.; TAIK, L. S. Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 375–382, 2004.
- THAKUR, V.; TEWARI, R.; SHARMA, Rohit. Evaluation of Production Parameters for Maximum Lipase Production by *P. stutzeri* MTCC 5618 and Scale-Up in Bioreactor. **Chinese Journal of Biology**, p.1-14, 2014.
- VALENTE, A.M.; ALEXANDRE, V.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 483-488, 2010.
- VASCONCELOS, W.E. RIOS, M.S. SOUSA, A.H. MEDEIROS, E.V. SILVA, G.M.C. MARACAJÁ, P.B. caracterização bioquímica e enzimática de *cunninghamella* isoladas de manguezal. **Revista de biologia e ciências da terra**. V.3, 2003.
- YADAV, SK, Bisht, D., Tiwari, S. e Darmwal, NS. Purificação, caracterização bioquímica e avaliação do desempenho de uma serina protease alcalina do mutante *Aspergillus flavus* MTCC 9952. **Biocatal. Agric. Biotechno.** 2015.
- ZAITSEV, S.Y.; SAVINA, A.A.; ZAITSEV, I.S. Biochemical aspects of lipase immobilization at polysaccharides for biotechnology. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 272, p. 102016-102016, 2019.