



PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS UTILIZANDO LIPASES MICROBIANAS

Maiara Fonseca Dias, Maurilio Lopes Martins, Roselir Ribeiro da Silva,

Larissa Mattos Trevizano

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais –

IFSudesteMG

RESUMO

Lipases apresentam como principal função biológica catalisar a hidrólise de triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol. Essas enzimas são utilizadas em diversos setores industriais, sendo um deles no tratamento de efluentes ricos em lipídios. Muitas indústrias não possuem tecnologia para o tratamento de efluentes e tornam-se responsáveis pela produção de resíduos com alta carga orgânica que são despejados no meio ambiente, contribuindo com a poluição hídrica. Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia alternativa, através do pré-tratamento enzimático utilizando lipases microbianas, para a redução da carga lipolítica de efluentes gerados em indústria de laticínios. As lipases bacterianas foram avaliadas quanto à sua termoestabilidade e à atuação enzimática durante o pré-tratamento na redução da carga orgânica. Constatou-se que as lipases permaneceram ativas até 24h a 40°C e ocasionaram produção efetiva de ácidos graxos livres até 12h de pré-tratamento enzimático.

Palavras-chave: lipases; pré-tratamento; lipídeos.



1. INTRODUÇÃO

As indústrias de alimentos, incluindo os laticínios, são economicamente importantes e, por isso, são consideradas um setor de grande relevância industrial. Porém, muitas dessas indústrias contribuem, significativamente, para a poluição hídrica, uma vez que um grande número dessas lançam seus efluentes nos cursos de água, aumentando a carga orgânica e, conseqüentemente, causando um maior impacto ambiental devido ao não tratamento desses efluentes (Silva, 2011).

Elevados teores de lipídios resultam na formação de uma camada de gordura nas lagoas de tratamento, que impede a transferência de oxigênio dos substratos e dos produtos, prejudicando o tratamento biológico aeróbio de degradação da matéria orgânica, podendo levar à morte dos microrganismos (Mendes et al., 2005). Diante desses problemas, processos alternativos, como o uso de lipases, vêm sendo utilizados visando à redução da concentração de lipídeos contidos nos rejeitos com elevada carga orgânica.

As lipases são enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa, capazes de catalisar naturalmente a hidrólise de ligações éster-carboxílicas dos acilglicerois, liberando glicerol e ácidos graxos livres (Bon et al., 2008; Ferraz et al., 2018). As enzimas apresentam um grande número de propriedades que ampliam o seu potencial de aplicação como catalisadores em processos industriais, o que possibilita o desenvolvimento de processos tecnológicos mais eficientes (Ghotra et al., 2002). Dentre as várias vantagens do uso das lipases no tratamento de efluentes, destacam-se: a simplicidade e a facilidade no controle do processo, aplicação em processos com baixa ou alta concentração de poluentes, estabilidade em operação com variações de pH, temperatura e salinidade (Castro et al., 2004). Além disso, não



há necessidade de utilização de enzimas puras para esse procedimento, o que significa processos mais baratos e realizados em menores tempos.

Desta forma, o presente estudo visou a aplicação de lipases provenientes de microrganismos na redução da carga lipolítica de efluentes de uma indústria de laticínios localizada na cidade de Rio Pomba, Minas Gerais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das lipases

Amostras de leite cru foram coletadas e utilizadas para a seleção de microrganismos lipolíticos e termotolerantes em meio de cultura PCA (*Plate Count Agar*) (Kasvi, Itália) suplementado com tributirina (Himedia, Índia). As colônias típicas foram selecionadas e repicadas para a obtenção de culturas puras. Os isolados obtidos foram cultivados por 18h, a 40°C e 150rpm, em um meio de cultura rico em carbono, nitrogênio e óleo de soja como fonte indutora da síntese de lipases, em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH = 7,0. Em seguida, o meio foi centrifugado por 15 min, 4°C e 7000g para obtenção do extrato enzimático.

2.2 Termoestabilidade Enzimática

Para a análise da estabilidade térmica das lipases, o extrato enzimático foi pré-incubado a 40°C por 12h e amostras foram coletadas nos respectivos tempos: 0, 2, 4, 6, 8 e 12h. Em seguida, cada amostra coletada foi submetida ao ensaio enzimático, em triplicata. Esse ensaio foi realizado a 37°C por 15min com a utilização de uma emulsão preparada com soro, solução emulsificante de lecitina de soja 10% e tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH = 7,0. Após os 15min de ensaio, a reação foi paralisada



com a adição de solução de acetona/etanol (1:1 v/v). A atividade enzimática foi determinada, em triplicata, através da quantificação dos ácidos graxos livres liberados durante a hidrólise utilizando o método de titulação com NaOH 0,05 M e fenolftaleína a 1 % (Leal, 2000).

2.3 Pré-Tratamento Enzimático do Efluente

Soro de leite proveniente da produção do queijo muçarela contendo uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de 14700 mg O₂/L, foi utilizado como fonte de efluente a ser tratado.

O efluente foi pré-tratado com a adição do extrato enzimático (188 U) a uma emulsão de soro e lecitina de soja a 10 % (1:4 v/v). Um experimento controle foi realizado com a substituição da enzima por água destilada. Os dois experimentos (enzimático e controle) foram incubados a 40°C por 12h, sob agitação. Amostras foram coletadas e paralisadas com a adição de solução de acetona/etanol (1:1 v/v) nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 12h. A eficiência da hidrólise enzimática do efluente foi avaliada através da determinação do teor de ácidos graxos livres totais liberados segundo Durli (2007). Os teores de ácidos graxos livres foram quantificados, em triplicata, pelo método de titulação com NaOH 0,05 M e fenolftaleína a 1% e controle do pH durante as titulações.

Além disso, após o tratamento, o efluente foi analisado quanto à DBO, segundo procedimento padrão (APHA, 2005), utilizando oxímetro digital coletor de dados com Software DO-5519 (Impac), a fim de verificar se as lipases atuaram na redução da carga lipídica do efluente tratado.

2.4 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A estabilidade térmica foi avaliada por meio de regressão linear; os pré-tratamentos pelo teste de Tukey 5% e as análises de DBO foram avaliadas através de uma variância fatorial 2/3, seguido de teste de Tukey 5%, realizado por *Statistica 13* (Dell, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção das Lipases

O ensaio em placa foi realizado a 40°C para a seleção de microrganismos lipolíticos que produziam lipases ativas e tolerantes a temperaturas mais elevadas para serem empregadas no pré-tratamento de efluentes. A tributirina foi utilizada nesse ensaio por ser um substrato lipídico que permite a detecção de colônias produtoras de lipases que são secretadas para o meio externo e que ao hidrolisarem o substrato evidenciam a formação de halos de hidrólise. A Figura 1 evidencia a formação de halos transparentes ao redor das colônias produtoras de lipases.

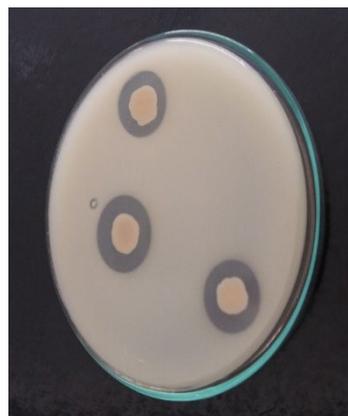


Figura 1 – Halos de hidrólise ao redor do isolado produtor de lipase obtido de leite cru.



Como muitos processos industriais são realizados em temperaturas mais elevadas, para aumentar o espectro de aplicação biotecnológica das lipases, testes de isolamento de microrganismos lipolíticos em temperaturas como 50 e 60°C foram realizados. Esses ensaios não permitiram a obtenção de microrganismos que apresentassem atividade lipolítica e, além disso, fossem produtores de lipases ativas em temperaturas elevadas. Pesquisas realizadas por Dors (2006), também mostraram que lipases apresentaram maior potencial de hidrólise de lipídeos em temperaturas entre 37 a 45°C.

3.2 Termoestabilidade Enzimática

Considerando que, segundo os ensaios preliminares, a produção efetiva de ácidos graxos livres ocorreu até 12h de tratamento, os novos ensaios de estabilidade térmica das lipases foram realizados possuindo 12h como tempo máximo de pré-incubação das enzimas. Dessa forma, a estabilidade térmica da lipase foi avaliada ao longo de 12h de incubação. De acordo com a Figura 2, observa-se que as enzimas permaneceram ativas até 12h de incubação a 40°C.

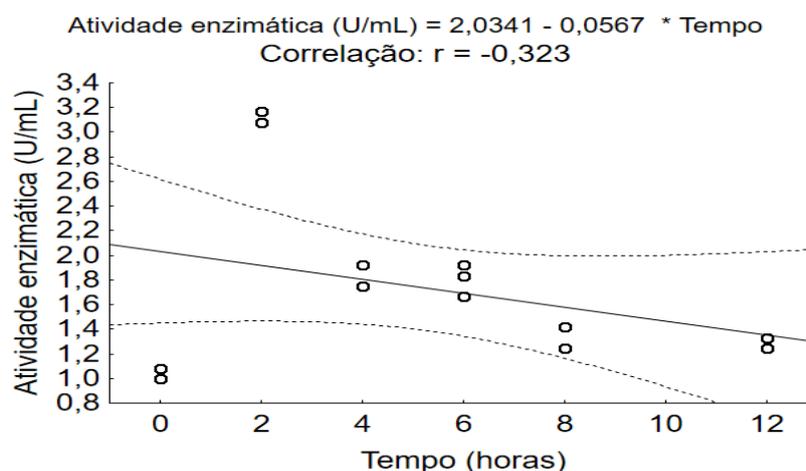


Figura 2 – Estabilidade térmica do extrato enzimático a 40°C.



Moraes (2014) constatou o decaimento da estabilidade térmica da lipase livre de *Fusarium solani* que, em apenas 3h, perdeu, aproximadamente, 50% da sua atividade quando incubada a 40°C. Carvalho et al. (2005) testaram a estabilidade térmica de lipases de diferentes fontes microbianas, nas quais foram incubadas por 1h em temperaturas entre 35 e 70°C. Os autores observaram que essas enzimas permaneceram estáveis na faixa de temperatura de 35 a 45°C. Basheer et al. (2011) verificaram que a enzima do fungo *Aspergillus awamori* BTMFW032 foi ativa em um intervalo de temperatura de incubação, embora a de 40°C apresentou o melhor resultado.

Como relatado, conclui-se que a avaliação da estabilidade térmica da lipase é de fundamental importância para a definição da temperatura e tempo do tratamento enzimático, sendo essas condições variáveis e dependentes do estudo bioquímico da enzima de interesse.

Pereira (2004) observou que a lipase de origem microbiana (*Candida rugosa*-LCR) apresentou uma atividade máxima na temperatura de 37°C, enquanto que as preparações de lipases de origem animal (pâncreas de porco-LPP e pancreatina-LKM) apresentaram uma temperatura ótima de 45 e 40°C, respectivamente. Além dos estudos de termoestabilidade enzimática, essas informações fortalecem a utilização de lipases em experimentos nas temperaturas próximas de 40°C.

3.3 Pré-tratamento Enzimático do Efluente

Os valores médios dos ácidos graxos livres produzidos durante o pré-tratamento do efluente, ao longo do tempo, utilizando o extrato enzimático são demonstrados na Figura 3.

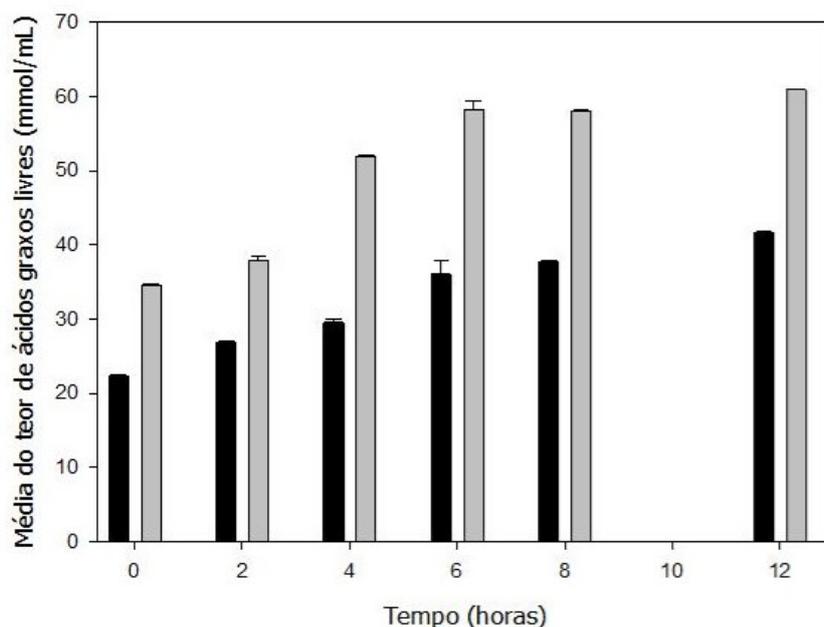


Figura 3 – Média do teor de ácidos graxos livres produzidos ao longo do tratamento enzimático do efluente. Barras em preto indicam a média do controle e barras em cinza indicam a média dos tratamentos enzimáticos.

Observa-se que as médias dos teores de ácidos graxos livres nos tempos 6 e 8h são estatisticamente iguais e uma maior produção de ácidos graxos livres foi observada no tempo de 12h de pré-tratamento ($p < 0,05$) (Figura 3). Sendo assim, inicialmente, sugere-se que essa enzima possa ser utilizada eficientemente até 12h de tratamento.

Porém, como já enfatizado, é importante descontar os ácidos graxos livres existentes no experimento controle. A Figura 4 apresenta a produção de ácidos graxos livres devido à atuação da lipase descontando os ácidos graxos livres previamente existentes no efluente.

Observa-se agora que a produção efetiva de ácidos graxos livres pela ação da lipase é iniciada em 4h de tratamento enzimático e não sofre alteração até 8h de tratamento ($p>0,05$) (Figura 4), levando-nos a concluir que o tempo ideal de tratamento enzimático utilizando a lipase é 4h.

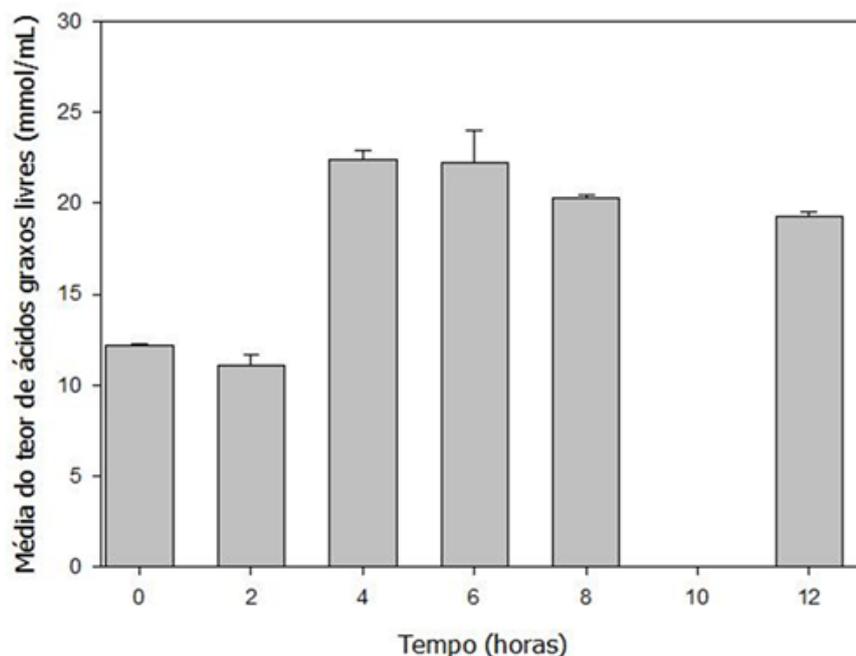


Figura 4 – Média do teor de ácidos graxos livres produzidos ao longo do tratamento enzimático descontando-se o controle em cada tempo.

3.4 Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

Os ensaios de DBO foram realizados para serem correlacionados com os resultados obtidos através da metodologia de titulação que permite a dosagem de

ácidos graxos livres produzidos pela ação da lipase durante o pré-tratamento enzimático do efluente e, dessa forma, permitir a confirmação da atuação das lipases na redução da carga lipídica do efluente tratado.

A Figura 5 mostra que o pré-tratamento enzimático diferiu estatisticamente do controle ao nível de 5% de significância, reduzindo a DBO (mg O₂/L) em 6,6%. Esses resultados demonstram que ocorreu a hidrólise lipídica de matéria orgânica pela ação das lipases culminando na redução da quantidade de oxigênio necessária para a metabolização da matéria biodegradável.

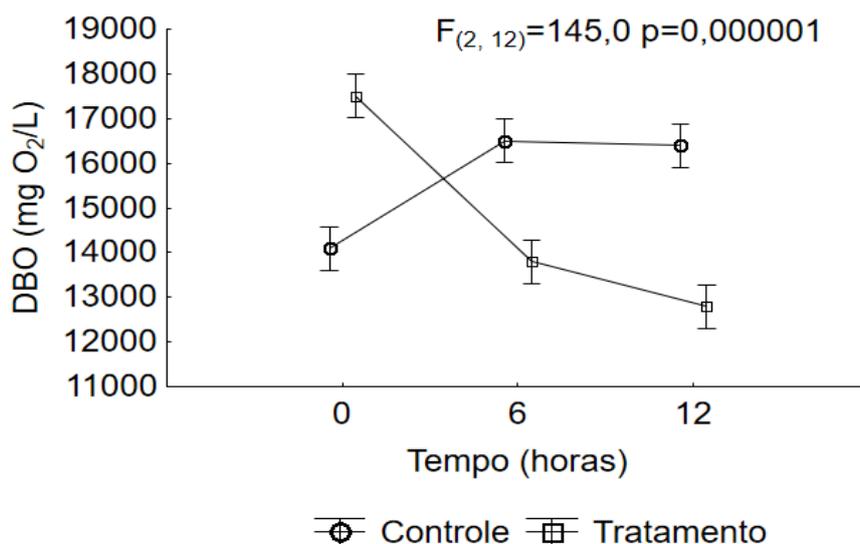


Figura 5 – Média de DBO (mg O₂/L) em diferentes tempos do pré-tratamento (controle e tratamento).

A média de DBO no tratamento no tempo 0h diferiu significativamente das médias dos tempos 6 e 12h, indicando uma redução da DBO nas 6h iniciais do tratamento enzimático. Porém, as médias nos tempos 6 e 12h foram estatisticamente



iguais, evidenciando que após 6h de tratamento, a demanda bioquímica de oxigênio não sofreu alteração. Sendo assim, de acordo com esse experimento, o pré-tratamento enzimático utilizando a lipase é eficiente até 6h.

Correlacionando os resultados de DBO obtidos com a produção efetiva de ácidos graxos livres, sugere-se utilizar a lipase no intervalo de tempo entre 4 e 6h de pré-tratamento enzimático para a redução da carga lipídica do efluente antes do mesmo ser conduzido sequencialmente às etapas convencionais de tratamento baseadas na fermentação anaeróbica. Será interessante também, em experimentos futuros, avaliar a eficiência do pré-tratamento enzimático nesse intervalo de tempo entre 4 e 6h.

Roveda (2007), através da caracterização dos efluentes da indústria de laticínios, encontrou na saída do equalizador valores para DBO de 452,0 mg/L e DQO de 803,27 a 4.975,95 mg/L. Já na saída do aerador, os valores encontrados de DBO foram de 255,3 mg/L e DQO de 76,58 a 2.810,22 mg/L. Ao final do processo de tratamento, observou-se reduções da matéria orgânica contida nos efluentes da indústria de laticínios, utilizando enzimas produzidas pelos fungos isolados dos próprios efluentes, durante a realização do processo fermentativo, cujos valores das concentrações para o efluente da saída do equalizador foi DQO $835,97 \pm 17,26$ mg/L e para o efluente da saída do aerador foi DQO $115,90 \pm 61,37$ mg/L.

Vilela (2012) observou a redução da DBO em 93,69% e da DQO em 95,54% pela linhagem *Cunninghamella elegans* URM6017 em meio contendo o efluente sólido de indústria de sorvete, após o 17º dia de tratamento enzimático.

Vale ressaltar que esses valores de DBO e DQO extraídos da literatura levam em consideração o processo completo de tratamento de efluentes, que incluem o pré-tratamento enzimático e as diversas etapas do tratamento convencional, possibilitando



assim, reduções significativas nos valores de DQO e DBO. O objetivo desse trabalho foi enfatizar que a etapa prévia de tratamento enzimático utilizando lipases contribui para a redução da carga lipídica, facilitando as etapas subsequentes de tratamento de efluentes, otimizando reduções nos valores de demanda bioquímica dos efluentes tratados e, além disso, possibilitando a diminuição da poluição hídrica.

4. CONCLUSÃO

Observou-se que a obtenção de lipases, provenientes de microrganismos isolados do ambiente, que apresentem elevado potencial lipolítico e também estabilidade térmica em altas temperaturas é bastante limitado. Por isso, muitos dos tratamentos enzimáticos utilizando lipases são realizados em temperaturas na faixa de 37 a 40°C, pois verifica-se uma maior atividade dessas enzimas.

Durante o pré-tratamento, o extrato enzimático obtido de bactéria isolada do leite cru produziu ácidos graxos livres de forma efetiva a partir de 4h de tratamento enzimático até as 12h do experimento.

De acordo as análises de DBO, o pré-tratamento enzimático utilizando o extrato enzimático é eficiente até 6h. Sendo assim, correlacionando os resultados de DBO com a produção efetiva de ácidos graxos livres, sugere-se utilizar o extrato enzimático no intervalo de tempo entre 4 e 6h de pré-tratamento para a redução da carga lipídica do efluente.



5. Agradecimentos

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Campus Rio Pomba pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA – American Public Health Association. (2005) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th, Washington DC, USA.

Basheer, S. M., Chellappan, S., Beena, P. S., Sukumaran, R. K., Elyas, K. K., & Chandrasekaran, M. (2011). Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment. *New Biotechnology*, 28, (6), 627-638.

Bon, E. P. S., Ferrara, M. A., Corvo, M. L., Vermelho, A. B., Paiva, C. L. A., Alencastro, R. B., & Coelho, R. R. R. (2008). *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Interciência: Rio de Janeiro. 506 p.

Carvalho, P. O., Calafatti, S. Ap., Marassi, M., Silva, D. M., Contesini, F. J., & Bizaco, R. (2005). Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Química Nova*, 28 (4), 614-621.

Castro, H. F., Mendes, A. A., Santos, J. C., & Aguiar, C. L. (2004). Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, 27, 146-156.



Dors, G. (2006). *Hidrólise enzimática e biodigestão de efluentes da indústria de produtos avícolas*. 112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química).

Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina.

Durli, E. (2007). *Tratamento de efluentes de indústria de laticínios utilizando lipases de Burkholderia cepacia LTEB11*. 111f. Dissertação (Mestrado em Química). Curitiba, Universidade Federal do Paraná.

Ferraz, J. L. A. A., Souza, L. O., Silva, T. P., & Franco, M. (2018). Obtenção de lipases microbianas: uma breve revisão. *Revista Ciências Exatas e Naturais – RECEN*, 20(1), 30-53.

Ghotra, B. S., Dyal, S. D., & Narine, S.S. (2002). Lipid shortenings: a review. *Food Research International*, 35 (10), 1015-1048.

Leal, M. C. M. R. (2000). *Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios*. Dissertação (Mestrado em Ciências, Engenharia Química). Rio de Janeiro, COOPE/IFRJ.

Mendes, A. A., Castro, H. F., Pereira, E. B., & Furigo Jr., A. (2005). Application of lipases for waste water treatment containing high levels of lipids. *Química Nova*, 28(2), 296–305.



Moraes, M. R. (2014). *Caracterização da lipase de Fusarium solani para aplicação em biocatálise*. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica). Curitiba, Universidade Federal do Paraná.

Pereira, E. B. (2004). *Tratamento enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas*. 171f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Química). Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina.

Roveda, M. (2007). *Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa*. 86f. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Passo Fundo, Universidade de Passo Fundo.

Silva, D. J. P. (2011). *Sistema de gestão ambiental para a indústria de laticínios*. 194f. Tese (Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Viçosa, Universidade Federal de Viçosa.

Vilela, M. L. (2012). *Tratamento biológico do resíduo da indústria de sorvetes por Zygomycetes*. 68f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos). Recife, Universidade Federal de Pernambuco.