



## Utilização de resíduos e coprodutos agroindustriais na produção de lipase

### Agro-industrial residues and co-products application for lipase production

Beatriz Cavalcante Santos<sup>1</sup>, Euzébio Marcelo Leandro Silva <sup>2</sup>, Taynná Cristina da Cunha Ferreira <sup>3</sup> Maraisa Lopes de Meneses<sup>4</sup>, Milena Martins Andrade<sup>5</sup>

#### RESUMO

O valor econômico agregado às enzimas, catalisadores biológicos, deve-se a ampla faixa de temperatura e pH, alta biodegradabilidade, elevada velocidade de reação, apresenta seletividade e eficiência. As lipases são enzimas com grande interesse industrial, são utilizadas nas indústrias de detergentes, de alimentos, de cosméticos e medicamentos, de couro e papel e celulose por catalisarem diversas tipos reações. Estas enzimas podem ser produzidas por micro-organismos a partir de resíduos e coprodutos agroindustriais, valorizando estes substratos e diminuindo o custo de produção. O objetivo deste trabalho foi produzir lipases pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 utilizando-se como substrato farinha das cascas de maracujá e de tamarindo. O fungo foi cultivado sob condição de fermentação submersa utilizando-se concentração de 2%, a 6% (m/v) destes substratos durante 5 dias a 28 C° e 180 rpm. O maior título de lipase foi obtido utilizando-se a farinha da casca de maracujá com granulometria de 270 mm e concentração de 6% (m/v), alcançando produção de lipase de 968 U/L. Estes resíduos constituem fontes promissoras de nutrientes para crescimento de micro-organismos e produção e enzimas, diminuindo os custos e agregando valor aos resíduos que antes eram descartados.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Botryosphaeria ribis* EC-01; cascas de maracujá; cascas de tamarindo; fermentação submersa.

#### ABSTRACT

The economic value added to enzymes biological catalysts is due to the wide range of temperature and pH, high biodegradability, high reaction speed, selectivity, and efficiency. Lipases are enzymes of great industrial interest; they are used in the detergent, food, cosmetics and medicine, leather and paper, and cellulose industries because they catalyze different reactions. These enzymes can be produced by microorganisms from agro-industrial waste and co-products, valuing these substrates and reducing production costs. This work aimed to produce lipases by the fungus *Botryosphaeria ribis* EC-01 using passion fruit and tamarind peel flour as a substrate. The fungus was cultivated under submerged fermentation conditions using 2% to 6% (w/v) of these substrates for five days at 28 C° and 180 rpm. The highest lipase titer was obtained using passion fruit peel flour with a particle size of 270 mm and a concentration of 6% (m/v), achieving lipase production of 968

<sup>1</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brazil. E-mail: bsantos.2019@alunos.utfpr.edu.br . ID Lattes:4915422164203744.

<sup>2</sup>Bolsista da Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: euzebio@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 7842010691771940.

<sup>3</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: taynna\_cris@hotmail.com. ID Lattes: 2498496207342893.

<sup>4</sup>Docente do Magistério Superior e Docente Permanente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: maraisal@utfpr.edu.br. ID Lattes: 8654977477455163.

<sup>5</sup>Docente do Magistério Superior e Docente Permanente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: milenaandrade@utfpr.edu.br. ID Lattes: 0974988053890754.



U/L. These residues constitute promising sources of nutrients for the growth of microorganisms and the production of enzymes, reducing costs and adding value to previously discarded residues.

**KEYWORDS:** *Botryosphaeria ribis* EC-01; passion fruit seed; tamarind peels; submerged fermentation.

## INTRODUÇÃO

Os catalisadores biológicos, as enzimas, são responsáveis por atuar em reações bioquímicas e em algumas das etapas do metabolismo celular de organismos vivos. Devido sua alta especificidade e atividade catalítica, as enzimas, possuem amplas aplicações industriais. Uma das enzimas de interesse industrial, as lipases, glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3) catalisam a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa (cadeia acila acima de 10 átomos de carbono), a diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol (ALI et al., 2023; JAEGGER; EGGERT, 2002; SHARMA et al., 2011).

Além da lipase produzida pelo pâncreas, essa também pode ser produzida por variedades de micro-organismo, como bactérias, leveduras e fungos. Dentre os micro-organismos, as lipases produzidas por fungos são valorizadas devido a alta estabilidade e facilidade de obtenção que ocorre principalmente por fermentação em estado sólido ou submersa (GEOFFRY; ACHUR, 2018).

O fungo filamentoso *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi isolado de cancro de eucalipto e se destacou como maior produtor de lipases quando comparado às outras espécies fúngicas isoladas. (MESSIAS et al., 2009). Resíduos e coprodutos agroindustriais foram testados na produção de lipases por este fungo alcançando um valor máximo de 76 U/mL utilizando torta de soja e glicerol somente com adição de água (ANDRADE et al., 2013). Este trabalho teve como objetivo produzir lipases pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 utilizando farinha de maracujá e tamarindo com substrato por fermentação submersa.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### MATERIAIS

Os substratos agroindustriais utilizados foram cascas de tamarindo coletados em uma propriedade rural localizada na cidade de Santa Fé do Sul, no estado de São Paulo e casca de maracujá fornecidas pela empresa Belo Pomar Polpas de Frutas, localizada em Ivaiporã-PR. O meio BDA (Batata Dextrose Agar) foi adquirido de Acumedia. O palmitato de *p*-nitrofenila utilizado como substrato para a atividade hidrolítica de lipase foi adquirido de Sigma Aldrich. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

### TRATAMENTO DOS SUBSTRATOS

As cascas de maracujá foram limpas com água deionizada, cortadas em pedaços de aproximadamente 3 cm e secas em estufa a  $70 \pm 2$  °C por 24 horas. Após secagem, foram trituradas em liquidificador doméstico e separadas por granulometria com auxílio de peneiras da série Tyler 30 a 400 mesh. A farinha da casca de maracujá obtidas nas granulometrias 60 e 270 mesh foram escolhidas para o estudo.

Os frutos de tamarindo foram separados da polpa e lavados com água destilada. As cascas foram secas em estufa durante 24 horas a  $50 \pm 2$ °C, foram trituradas em um liquidificador doméstico e separadas por granulometria com peneiras da série Tyler 30 a



400 mesh. A farinha de casca de tamarindo com granulometria de 400 mesh foi escolhida para o estudo.

#### PRODUÇÃO DE LIPASES UTILIZANDO *Botryosphaeria ribis* EC-01

O micro-organismo utilizado foi *Botryosphaeria ribis* EC-01 (GenBank Accession Number DQ852308) mantido em BDA inclinado a  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e repicados trimestralmente. *B. ribis* EC-01 foi transferido do meio de manutenção para placas de Petri com meio BDA e incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  por 5 dias. Após esse tempo, quatro esferas (7 mm de diâmetro) contendo hifas do micro-organismo foram utilizadas para inocular frascos de *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 25 mL de meio composto por diferentes concentrações (2%, 4% e 6%, m/v) de farinha das cascas de maracujá com granulometrias de 60 e 270 mm e farinha das cascas de tamarindo com granulometria de 400 mm, em água destilada. Os respectivos cultivos em duplicata permaneceram durante 5 dias em incubadora *shaker* a 180 rpm e  $28^{\circ}\text{C}$ . A cultura obtida foi centrifugada (5000 rpm por 15 min) e o sobrenadante recuperado foi armazenado a  $4^{\circ}\text{C}$  até determinação da atividade enzimática.

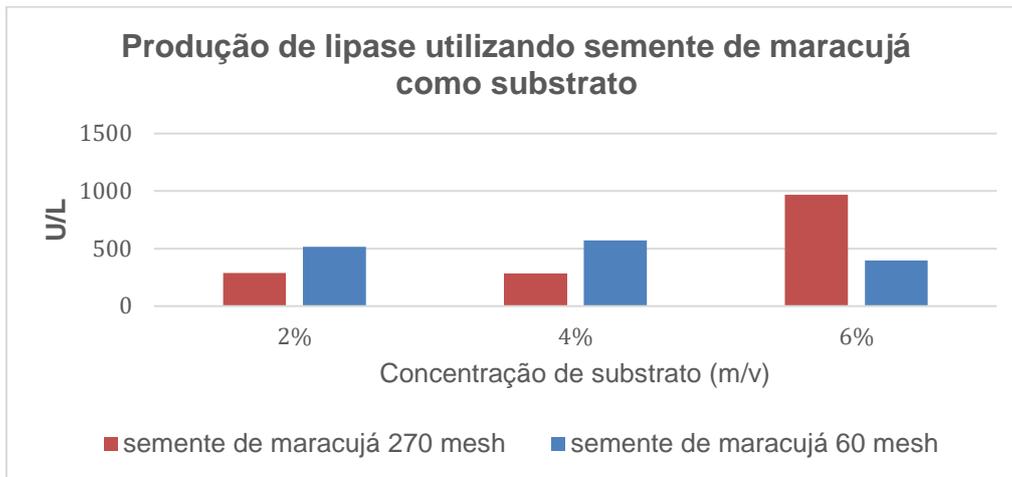
#### ENSAIO DA ATIVIDADE DE LIPASE

A atividade de lipase foi determinada utilizando palmitato de *p*-nitrofenila (pNPP) em meio aquoso, contendo surfactante Triron X-100 (WINKLER, 1979), utilizando-se tampão fosfato pH 8,0, temperatura de  $55^{\circ}\text{C}$ , tempo de 2 min e leitura a 410 nm (MESSIAS et al., 2009). A unidade de lipase foi definida como a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de pNP por min, por mL da solução de enzima

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das médias de atividade enzimática estão expressos em U/L (atividade volumétrica) em função da concentração de substrato em um tempo total de cinco dias de fermentação submersa. Na Figura 1, pode-se observar os resultados obtidos na produção de lipase por *B. ribis* EC-01 utilizando farinha de cascas de maracujá nas granulometrias de 60 e 270 mesh com concentração de 2%, 4% e 6% (m/v). É possível observar que a atividade lipolítica foi acentuada para a granulometria de 270 mm e concentração de 6% (m/v), alcançando produção de lipase de 968 U/L.

Figura 1 - Produção de lipase utilizando farinha de cascas de maracujá como substrato

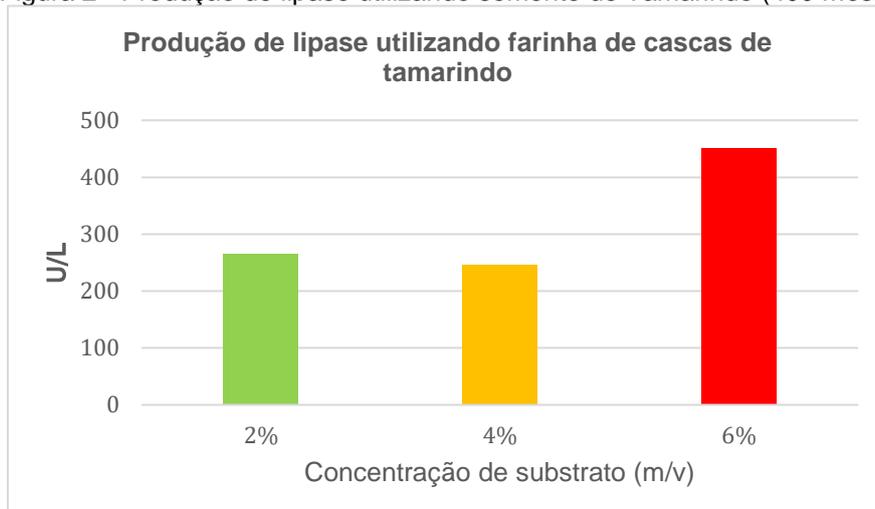


Fonte: Autoria própria (2023).

Os resíduos agroindustriais como casca de maracujá são baratos e muito cultivados em países como o Brasil, podendo reduzir o custo de produção de enzimas. O Brasil é o maior produtor mundial do fruto com 690.364 toneladas colhidas em 2020 (EMBRAPA, 2023). O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*) possui em sua composição compostos bioativos como glicosídeos, alcaloides e compostos fenólicos (DHAWAN, 2004), sendo que cerca de 70 a 80% do peso do fruto não é aproveitado pelas indústrias de suco, sobrando um grande volume de resíduos não utilizados, portanto se tornando interessantes fontes de nutrientes para cultivar micro-organismos e produzir enzimas.

A Figura 2 apresenta a produção de lipases por *B. ribis* EC-01 em meio de cultivo contendo farinha de cascas de tamarindo a 2%, 4% e 6% (m/v) durante cinco dias de fermentação submersa a 28 °C. Como pode ser observado, o maior valor de atividade enzimática foi obtido a 6 % (m/v), sendo este de 452 U/L.

Figura 2 - Produção de lipase utilizando semente de Tamarindo (400 mesh)



Fonte: autoria própria (2023).

Comparando-se os resultados obtidos na produção de lipases utilizando-se a farinha de cascas de tamarindo e farinha de cascas de maracujá, nota-se uma diminuição na



produção. Este fato pode ser devido a farinha de cascas de tamarindo conter baixa concentração de proteínas e lipídeos, essenciais para o desenvolvimento do micro-organismo e produção de lipases, além disso o valor do pH é ácido (SILVA et al., 2020).

## CONCLUSÃO

A aplicação de resíduos agroindustriais como farinha de cascas de maracujá e de tamarindo apresentou maiores atividades lipolíticas a 6% (m/v), sendo que a farinha de maracujá com textura mais fina (270 mesh) proporcionou a maior produção de lipases. Estes resíduos constituem fontes promissoras de nutrientes para crescimento de micro-organismos e produção e enzimas, diminuindo os custos e agregando valor aos resíduos que antes eram descartados.

## Agradecimentos

Ao laboratório da UTFPR LAMAP - Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa do campus Apucarana.

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

ALI, Sajid *et al.* The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], 17 fev. 2023. DOI <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020510>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/2/510>. Acesso em: 29 ago. 2023.

ANDRADE, M. M.; BARBOSA, ANELI M.; BOFINGER, MATHEUS R; DEKKER, ROBERT F. H.; MESSIAS, JOSANA M.; GUEDES, CARMEN L. B.; ZAMINELLI, TIAGO; DE OLIVEIRA, BRUNO H.; DE LIMA, VALÉRIA M. G.; DALL'ANTONIA, LUIZ H. Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on soybean and castorbean meals: optimization. Immobilization and application for biodiesel production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, p. 1792-1806, 2013.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Maracujá. Disponível em: <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/maracuja>. Acesso em: 18 set. 2023.

GEOFFRY, Kiptoo; ACHUR, Rajeshwara N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 14, p. 241–253, 2018. Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818117305674?ref=pdf\\_download&fr=RR-2&rr=7fdf8ca2bdc4a5d7](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818117305674?ref=pdf_download&fr=RR-2&rr=7fdf8ca2bdc4a5d7). Acesso em: 28 ago. 2023.

HE, Yaojia *et al.* A novel strategy for biodiesel production by combination of liquid lipase, deep eutectic solvent and ultrasonic-assistance in scaled-up reactor: Optimization and kinetics. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 372, 24 ago. 2022. Disponível em:



<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652622033170>. Acesso em: 28 ago. 2023.

MESSIAS, Josana M. *et al.* Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, SP, Brasil, v. 45, p. 426-431, 19 ago. 2009. DOI 10.1016/j.enzmictec.2009.08.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022909001872>. Acesso em: 29 ago. 2023.

PONNARASY, G. *et al.* Light Induced Esterification of Oleic Acid Catalyzed by *Pseudomonas Cepacia* Lipase. **International Journal of Environmental Science and Development**, [s. l.], v. 5, ed. 4, p. 344-346, 2014. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/271301125\\_Light\\_Induced\\_Esterification\\_of\\_Oleic\\_Acid\\_Catalyzed\\_by\\_Pseudomonas\\_Cepacia\\_Lipase](https://www.researchgate.net/publication/271301125_Light_Induced_Esterification_of_Oleic_Acid_Catalyzed_by_Pseudomonas_Cepacia_Lipase). Acesso em: 29 ago. 2023.

REMONATTO, Daniela *et al.* Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. **Process Biochemistry**, SP, Brasil, v. 114, p. 1-20, 5 jan. 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511322000046>. Acesso em: 28 ago. 2023.

SILVA, Emerson Iago Garcia e *et al.* Caracterização físico-química dos resíduos do Tamarindo (*Tamarindus indica* L): potencial nutricional e antinutricional. **O Mundo da Saúde**, v. 44, p. 595-606, 2020.