



Uso de óleo e sementes de tucumã (*Astrocaryum* sp) na produção de lipases

Use of Tucumã (*Astrocaryum* sp) oil and seeds on lipase production

João Vitor Carvalho Fontanini¹, Hélvia Nancy Fuzer Lira², Milena Martins Andrade³

RESUMO

As lipases são enzimas responsáveis pela catálise das reações de hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa, podendo ser obtidas por diversas fontes. Entre elas se destaca a microbiana e entre os micro-organismos produtores de lipase, os fungos são preferíveis pela facilidade de cultivo e obtenção destas enzimas. Este trabalho teve o objetivo de produzir lipases pelo fungo filamentososo *Botryosphaeria ribis* EC-01 por fermentação submersa utilizando resíduos agroindustriais derivados do fruto tucumã (*Astrocaryum* sp). *B. ribis* EC-01 foi inoculado em diferentes concentrações dos substratos óleo (0,5 – 2 %, m/v), farinha da casca (2 – 6 %, m/v) e farelo da amêndoa (2 – 6 %, m/v) de tucumã a 28 °C. A atividade de lipase foi determinada por UVVis pelo método da hidrólise do pNPP. A maior atividade obtida foi de 2992 U/L utilizando o óleo de tucumã na concentração de 0,5 % (m/v). Os substratos avaliados foram capazes de induzir a produção de lipases, constituindo fontes baratas que diminuem o custo de produção destas enzimas.

PALAVRAS-CHAVE: *Botryosphaeria ribis* EC-01; fermentação submersa; resíduos agroindustriais

ABSTRACT

Lipases are enzymes responsible for the triglycerides of long-chain hydrolysis catalysis and can be obtained by several fonts. Between them stands the microbial one, and among the microorganisms that produce lipase, the fungi are the most desired because of the facility of cultivation and obtention of these enzymes. This work intended to produce lipase by the filament fungi *Botryosphaeria ribis* EC-01 by submerged fermentation using agro-industrial derived from tucumã fruit waste (*Astrocaryum* sp). *B. ribis* EC-01 was inoculated in different concentrations of the subtracts oil (0.5 – 2%), shell flour (2 – 6% m/v), and nut bran (2 – 6%, m/v) of tucumã at 28°C. The lipase activity was determined by UV/VIS and the hydrolysis of the pNPP method. The highest activity obtained was 2991 U/L using tucumã oil at a concentration of 0.5% (m/v). The subtracts evaluated could induce lipase production, consisting of cheap fonts that reduce the cost of these enzymes production.

KEYWORDS: *Botryosphaeria ribis* EC-01; submerged fermentation; agro-industrial waste.

INTRODUÇÃO

Na crescente busca pelo avanço técnico e científico atual, o mercado tem se voltado cada vez mais para um certo grupo de polímeros que catalisam diversas reações químicas: as enzimas (RAMÍREZ; ACEVES, 2014). Processos utilizando enzimas como catalisadores são geralmente mais eficientes, e ambientalmente sustentáveis (MONTEIRO; SILVA, 2009). Assim, com resultados promissores, e aspecto de sustentabilidade, as enzimas se mostram como um ramo prospero para o investimento industrial. As lipases são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise

¹ Voluntário, Discente da UTFPR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: joaofontanini@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 6517785950819977.

² Docente do Magistério Superior da Coordenação de Licenciatura em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: helvialira@utfpr.edu.br. ID Lattes: 4782388761219226.

³ 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.



de triglicerídeos de cadeia longa (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006) e são o grupo mais importante de enzimas para biocatálise em aplicações biotecnológicas (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006) (JAEGER; EGGERT; 2002), podendo ser utilizadas na produção de biodiesel, na indústria têxtil, farmacêutica, e possivelmente até no tratamento do câncer (CHANDRA et al., 2020).

As lipases podem ser obtidas por diversas fontes como a animal, vegetal e microbiológica (CHANDRA et al., 2020). Entre os micro-organismos produtores de lipases, foi escolhido o fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 para a produção sob fermentação submersa, o qual apresenta resultados promissores produzindo em óleos e álcoois como os óleos de soja, mamona, e o glicerol (ANDRADE et al., 2013; CARVALHO et al., 2023).

Frutos amazônicos tem grande relevância para o estudo, uma vez que possuem macro e micronutrientes, os quais podem ser interessantes do ponto de vista biológico para a produção de enzimas (CARVALHO et al., 2023). O Tucumã (*Astrocarium sp*), um fruto de cor amarelada rico em fibras e lipídios (COSTA et al., 2010). Após o consumo da polpa do fruto, os caroços são descartados no lixo e não são reaproveitados, sendo que a amêndoa do tucumã possui alto teor de óleo (BARBORASA et. al., 2009). Desta forma, tanto o óleo extraído como as sementes podem ser utilizados como fonte lipídica, de carbono e nitrogênio na produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01. Portanto, esse trabalho teve o objetivo de utilizar o tucumã integralmente para produção experimental de lipases por este fungo sob fermentação submersa.

METODOLOGIA

MATERIAIS

O fruto (Tucumã), substrato utilizado, foi gentilmente doado pela Prof^a Dr^a Helvia Lira que forneceu o óleo do fruto, casca, e a farinha da amêndoa (endocarpo). Também foi utilizado como meio sólido o Batata dextrose ágar – BDA (Acumedia), bem como o padrão na determinação de lipases palmitato de *p*-nitrofenila (Sigma-Aldrich).

MANUTENÇÃO DO MICRO-ORGANISMO E PRODUÇÃO DO INÓCULO

O micro-organismo utilizado foi *Botryosphaeria ribis* EC-01 (GenBank Accession Number DQ852308) mantido em BDA (Batata Dextrose Agar) a 4 ± 2 °C, que foi repicado do meio de manutenção para placas de Petri e deixado em estufa a 28 °C por 5 dias para o seu desenvolvimento. Após esse tempo, quatro discos (~0,7 cm diâmetro) contendo hifas foram utilizados para inocular frascos *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 25 mL de meio compostos pelos substratos (Tabela 1) em água destilada.

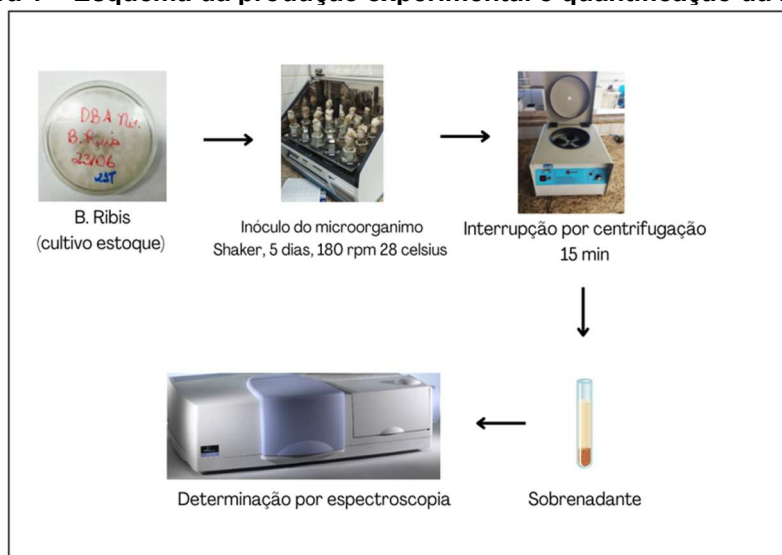
Tabela 1 – Concentrações dos substratos provenientes do tucumã

Substrato	Concentrações (%)		
Óleo	0,5	1	2
Farelo da casca	2	4	6
Farinha da amêndoa	2	4	6

Fonte: Elaborado pelos autores.

Os frascos permaneceram durante cinco dias em uma incubadora *shaker* a 180 rpm e 28 °C. Os experimentos foram conduzidos em triplicata para cada concentração. Após esse tempo, os cultivos foram interrompidos por centrifugação (6000 rpm/15 min) e os sobrenadantes foram utilizados como fonte de lipases (Figura 1).

Figura 1 – Esquema da produção experimental e quantificação da lipase.



Fonte: Autores.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a determinação da atividade da lipase foi utilizado o método de Espectroscopia UV/VIS, baseada na reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) pela lipase em solução aquosa (WINKLER; STUCKMANN, 1979), contendo o surfactante Triton. Na reação de hidrólise, o *p*-nitrofenol (*p*-NP) é liberado, o qual possui coloração amarelada, que absorve a luz incidida no comprimento de onda 410 nm para a leitura no equipamento (Figura 1). A reação foi conduzida em tampão fosfato pH 8, 55 °C e 2 minutos (MESSIAS et al., 2009). Uma atividade de lipase (1U) foi definida como 1 μmol de *p*NP (*p*-nitrofenol), liberado por minuto por mL da solução da enzima.

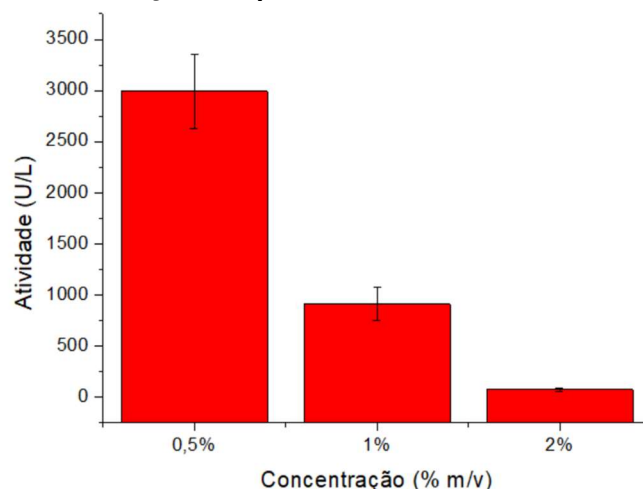
RESULTADOS E DISCUSSÕES



A produção de lipases pelo fungo *B. ribis* EC-01 foi avaliada com o aproveitamento integral do tucumã. Na Figura 2 é possível observar os resultados obtidos com utilização do óleo como substrato. É possível notar que a concentração que induziu a produção de lipases foi a de 0,5 % (m/v), obtendo-se atividade de 2992 ± 365 U/L. O aumento da concentração do óleo desfavoreceu a produção desta enzima, sendo que a 2 % (m/v), maior concentração avaliada, a atividade decaiu quase 98 % (71,71 U/L).

Fontes lipídicas são conhecidas por induzir a produção de lipases (MESSIAS et al., 2009) e a menor concentração avaliada (0,5 %, m/v) foi responsável pela maior atividade. Isto pode ser devido ao óleo de tucumã conter diversos ácidos graxos, principalmente o palmítico (16:0), o oleico (C18:1), e o linoleico (C18:2) (SILVA et al., 2022). Entretanto, o decaimento da produção desta enzima com o incremento da concentração pode ser devido a presença de certos componentes no óleo e seu valor de pH levemente ácido, em torno de 5,5 (SILVA et al., 2022). Como também, por conter β -caroteno em sua composição que segundo Abdulhadi et al. (2020) possui atividade antimicrobiana, inclusive contra fungos, inibe o seu desenvolvimento e, conseqüentemente, diminui a produção dos metabólitos de interesse.

Figura 2 – Produção de lipases utilizando do óleo de tucumã.

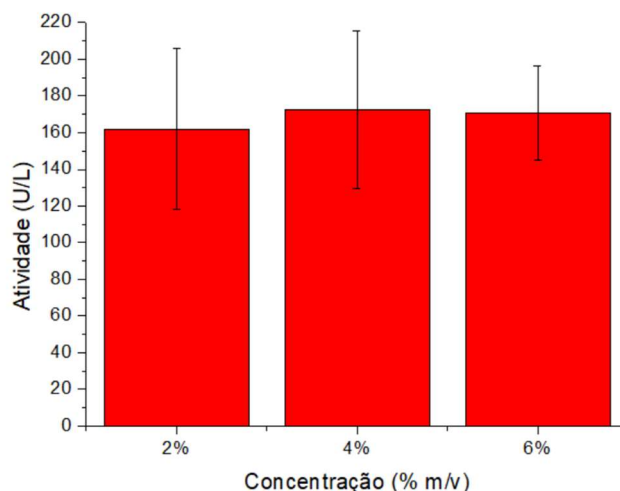


Fonte: Autores.

A Figura 3 apresenta os resultados alcançados utilizando farinha da casca do tucumã como substrato. Como pode ser observado no gráfico abaixo, as concentrações avaliadas promoveram resultados semelhantes na produção de lipases por *B. ribis* EC-01, com máximo de produção de 173 ± 43 U/L a 4% (m/v). Este substrato parece não ter sido suficiente isoladamente para a produção desta enzima.



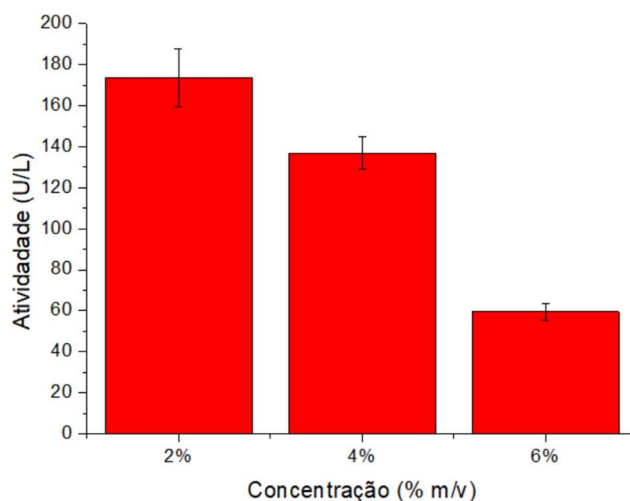
Figura 3 – Produção de lipases utilizando a farinha da casca de tucumã.



Fonte: Autores.

A Figura 4 apresenta os resultados da atividade enzimática, com a farinha da amêndoa do Tucumã, como substrato. Para este substrato houve maior atividade enzimática para a concentração de 2% (m/v), sendo essa igual a 174 ± 14 U/L.

Figura 4 – Produção de lipases utilizando farinha da amêndoa de tucumã.



Fonte: Autores.

Observa-se que houve diminuição da atividade com o incremento da concentração mais uma vez, que pode ser justificado pela amêndoa possuir em grande parte óleo, inibindo desta forma o desenvolvimento do micro-organismo por conter compostos antimicrobianos (ABDULHADI et al., 2020).



CONCLUSÕES

A produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 utilizando o fruto tucumã mostrou que os substratos isoladamente induzem a produção desta enzima, entretanto em baixa concentração, sendo necessário, em estudos futuros, a complementação do meio de cultivo. É importante ressaltar que com apenas 0,5 % (m/v) de óleo de tucumã, o melhor resultado foi alcançado, evidenciando que estes substratos constituem fontes econômicas para a produção destas enzimas, agregando valor a esses resíduos.

AGRADECIMENTOS

À UTFPR, através do Programa Institucional de Voluntariado em Iniciação Científica (PIVIC) pela oportunidade. E aos laboratórios multiusuário de apoio à pesquisa científica do campus Apucarana, Laboratórios LAMAP.

CONFLITO DE INTERESSE

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ABDULHADI, S. Y.; GERGEES, R.N.; HASAN, G.Q. **Molecular Identification, Antioxidant Efficacy of Phenolic Compounds, and Antimicrobial Activity of Beta-Carotene Isolates from, Fruiting Bodies of Suillus sp.** Revista Karbala International, V.6 n. 7, 2020.

ANDRADE, M. M. et al. 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, n. 7, p. 1792–1806, ago. 2013.

CARVALHO, A. S. S. et al. **Lipase Production by Yarrowia lipolytica in Solid-State Fermentation Using Amazon Fruit By-Products and Soybean Meal as Substrate.** Revista Catalysts, v. 13, n. 2, p. 289, 27 jan. 2023.

CHANDRA, P. et al. **Microbial Lipases and Their Industrial applications: a Comprehensive Review.** Revista Microbial Cell Factories, v. 19, n. 1, 26 ago. 2020.

COSTA, J. R.; LEEUWEN, J. V.; COSTA, A. J. **Tucumã-do-amazonas *Astrocaryum tucuma* Martius.** 2010. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/1/39084/1/Tucuma-do-Amazonas%20Shanley%20et%20al.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2023.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases.** Enzyme and Microbial Technology. v. 39, n. 2, p. 235–251, jun. 2006.



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

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases**. Revista Enzyme and Microbial Technology. v. 39, n. 2, p. 235–251, jun. 2006.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. DO N. **Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática**. Revista Processos Químicos, v. 3, n. 5, p. 9–23, 2 jan. 2009.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G; DEKKER, R .F. H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A. M. 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**, v. 45, p. 426-431, dez 2009.

RAMÍREZ, J. R. ACEVES, M. A. **ENZIMAS: ¿QUÉ SON Y CÓMO FUNCIONAN?** Revista Digital Universitária. 2014. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ru.tic.unam.mx/handle/123456789/2274>>. Acesso em: 10 de setembro de 2023.

SILVA, I. R. da et al. **Potencial de utilização de óleos fixos de tucumãs**. Revista Nativa, Sinop v. 10, n. 1, p 109-116, 2022.

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