

Produção de lipases utilizando óleo de *Passiflora edulis* extraído de sementes de maracujá

Production of lipases using *Passiflora edulis* oil extracted from passion fruit seeds

Taynná Cristina da Cunha
Ferreira

taynna_cris@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Apucarana, Paraná,
Brasil

Vitor Quitto Amaral Reis

vitorquitto1@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Apucarana, Paraná,
Brasil

Giovanna Giacobbo Alves

giih_alves@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Apucarana, Paraná,
Brasil

Rúbia Michele Suzuki

rubiasuzuki@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Apucarana, Paraná,
Brasil

Alessandra Machado Baron

alessandrab@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Apucarana, Paraná,
Brasil

Patrícia Salomão Garcia

patriciagarcia@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Apucarana, Paraná,
Brasil

Milena Martins Andrade

milenaandrade@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Apucarana, Paraná,
Brasil

Recebido: 31 ago. 2018.

Aprovado: 04 out. 2018.

Direito autoral:

Este trabalho está licenciado sob os
termos da Licença
Creative Commons-Atribuição 4.0
Internacional.



RESUMO

O Brasil é o maior produtor de maracujá e no processamento da fruta cerca de 40% são cascas e sementes que são descartados. As sementes contêm grande quantidade de óleo que pode ser utilizado na produção de lipases. As lipases são enzimas amplamente utilizadas na indústria, produzidas por plantas, animais e micro-organismos, como bactérias e fungos. O fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi selecionado com bom produtor de lipases crescendo em óleos vegetais. O objetivo deste trabalho foi produzir lipases por fermentação submersa utilizando *B. ribis* EC-01 e óleo de *Passiflora edulis* (maracujá) como fonte nutricional. O óleo foi extraído com diclorometano, etanol/metanol e água e também pelo método de Bligh & Dyer. A produção foi testada em concentrações crescentes de óleo de 0,5 a 2 % (v/v) adicionado ou não de meio mínimo de sais de Vogel (MMSV) a 28 °C e 180 rpm por 5 dias. As proteínas totais foram determinadas. Não houve diferença significativa entre os métodos testados de extração de óleo da semente. A melhor produção de lipases (275 U/mg) foi alcançada na concentração de 0,5 % (v/v) com adição de MMSV. A extração de óleo das sementes de maracujá foi eficiente e seu uso na produção de enzimas resultou em alta atividade específica de lipase, constituindo uma forma econômica e sustentável de produção de lipase por *B. ribis* EC-01.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação submersa. *Botryosphaeria ribis* EC-01. Produção de enzimas.

ABSTRACT

Brazil is the largest passion fruit producer and after fruit processing about 40% are peels and seeds that are discarded. The seeds contain large amount of oil that can be used in lipases production. Lipases are enzymes widely used in industry, produced by plants, animals and microorganisms, such as bacteria and fungi. The fungus *Botryosphaeria ribis* EC-01 was selected as the best lipase producer grown in vegetable oils. The objective of this work was to produce lipases by submerged fermentation using *B. ribis* EC-01 and *Passiflora edulis* oil (passion fruit) as nutrient source. The oil was extracted with dichloromethane, ethanol/methanol and water and also by Bligh & Dyer method. Lipase production was tested at increasing oil concentrations of 0.5 to 2% (v/v) added or not of Vogel minimum salts medium (VMSM) at 28 °C and 180 rpm for 5 days. Total proteins were determined. There was no significant difference between oil seed extraction methods tested. Best lipase production (275 U/mg) was achieved at 0.5% (v/v) concentration with VMSM addition. Oil extraction from passion fruit seed was efficient and its use on lipase production resulted in high lipase specific activity, constituting an economical and sustainable form of *B. ribis* EC-01 lipase production.

KEYWORDS: Submerged fermentation. *Botryosphaeria ribis* EC-01. Enzymes production.

INTRODUÇÃO

Lipase é nome dado a um grupo de enzimas que fazem parte da classe das hidrolases, com atuação em ligações éster e são definidas como glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3) que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa em diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol. Estas enzimas são amplamente distribuídas em plantas, animais e micro-organismos e se destacam em aplicações biotecnológicas por sua versatilidade de reações de hidrólise, esterificação, transesterificação, aminólises, entre outras (JAEGER; REETZ, 1998; SHARMA et al., 2001).

Fungos do gênero *Botryosphaeria* secretam diferentes enzimas como lipases, lacases, pectinases, beta-1,3-glucanases, celulases, xilanases, amilases e inulinases (CUNHA et al., 2003). *Botryosphaeria* EC-01 foi previamente selecionado como bom produtor de lipases entre nove isolados de *Botryosphaeria* spp. quando cultivado em diferentes óleos vegetais e glicerol por fermentação submersa (MESSIAS et al., 2009).

O Brasil é o maior produtor de maracujá com produção de 635 mil toneladas no ano de 2015 (IBGE). No processamento da fruta são gerados cerca de 40% de resíduos formados principalmente por cascas e sementes. As sementes contém grande quantidade de óleo que geralmente são descartados (CHAU et al., 2004; MALACRITA; JORGE, 2012) podendo constituir substratos baratos para a produção de lipases. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo produzir lipases por *Botryosphaeria* EC-01 utilizando como fonte de nutriente o óleo de *Passiflora edulis*, extraído de sementes de maracujá, tornando a produção desta enzima econômica.

MÉTODOS

AMOSTRAGEM E PREPARO DAS SEMENTES

As sementes de maracujá, um resíduo gerado na produção da polpa, foram fornecidas pela empresa Polpa Norte, localizada na cidade de Japurá-PR. Primeiramente as sementes foram lavadas, para retirada de resíduos, e secas em estufa a 60 °C por aproximadamente 4 horas e posteriormente armazenadas em ambiente refrigerado.

EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS

As sementes de maracujá foram trituradas e peneiradas em peneira de 2,4 mm. Em seguida, 5,0 gramas de semente foram misturados a 10,0 mL de metanol ou etanol, 7,5 mL de diclorometano e 2,5 mL de água em agitação magnética por 5 minutos. Após este tempo, adicionou-se 55,6 mL de diclorometano e 18,7 mL de água deixou-se em agitação por mais 5 minutos. Posteriormente, a mistura foi filtrada a vácuo e o filtrado foi armazenado em um funil de separação que foi deixado em repouso por um dia. A fração inferior contendo os lipídios foi



recolhida em balão de fundo chato e rotaevaporado a 40 °C. Após a evaporação, o óleo foi recolhido e armazenado em ambiente refrigerado.

A extração de lipídeos também foi testada com etanol e pelo método proposto por Bligh&Dyer (1959), que utiliza metanol, clorofórmio e água na razão de 2:2:1,8 (v/v/v).

PRODUÇÃO DE INÓCULO E OBTENÇÃO DE LIPASES

O micro-organismo utilizado foi o *Botryosphaeria ribis* EC-01 (GenBankAccessionNumber DQ852308) que foi mantido em BDA inclinado a 4 °C e repicado trimestralmente. *B. ribis* EC-01 foi transferido do meio de manutenção para placas de *Petri* contendo meio mínimo de Vogel(1956), glucose 1 % (m/v) e ágar 2 % (m/v) que foram incubadas à 28 ± 2 °C por 5 dias. Esferas de 0,7 cm de diâmetro foram cortadas e inoculadas em frascos de *Erlenmeyer* de 50,0mL com 10,0mL de meio composto por 0,5 %, 1 % e 2 % (v/v) de óleo de *P. edulis*, com e sem Vogel. Os cultivos foram mantidos sob agitação, em *shaker* (180 rpm) por 5 dias a 28°C, e interrompidos por centrifugação (5000 rpm/15 min). Os extratos brutos livres de células foram armazenados a 4°C e utilizados como fonte de lipases.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASE E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A atividade de lipase foi determinada espectrofotometricamente, utilizando-se *p*-NPP como substrato, em pH 8,0, 55 °C, 2 min e 410 nm (MESSIAS et al., 2009). A unidade de lipase foi definida como a liberação de 1,0 µmol de *p*-NPP por min, por mL da solução de enzima. A concentração de proteínas extracelulares foi determinada pelo método de Bradford (1976).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos na extração de lipídeos das sementes de *P. edulis* pelo método de Bligh&Dyer (1959) e pelo método de extração com misturas ternárias com os solventes: diclorometano, metanol/etanol e água. Os três processos de extração não demonstraram diferença significativa ($p \leq 0,05$), com média de rendimento de 20,7 %. Considerando que um dos métodos de extração com mistura ternária utiliza o etanol, este é preferível, por não apresentar toxicidade ao ambiente e proveniente de fonte renovável.

Tabela 1 – Lipídios Totais (g.100.g-1) presentes em sementes de maracujá obtidos pelos métodos avaliados

Extração	Lipídios (g/100g amostra)
Bligh&Dyer	21,446± 0,3313
Diclorometano-metanol-água	21,073 ± 0,5791
Diclorometano-etanol-água	19,589 ± 0,3333

Fonte: Autoria própria (2018)

O óleo resultante destas extrações foi misturado e utilizado na produção de lipases.

PRODUÇÃO DE LIPASES POR *BOTRYOSPHERIA RIBIS* EC-01

A produção de lipases por *B. ribis* EC-01 foi avaliada utilizando-se diferentes proporções (0,5%, 1%, 2%, v/v) de óleo de *P. edulis* em meio contendo somente água destilada (sem MMSV) e meio contendo água destilada e MMSV (com MMSV) em fermentação submersa. A Tabela 2 apresenta os resultados de atividade de lipase, proteínas totais e atividade específica.

Tabela 2 – Atividade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 produzida em óleo de *Passiflora edulis* como substrato

Amostra	U/mL	Proteínas (mg/mL)	U/mg
0,5 % (v/v) sem MMSV*	1,83	0,01	183
1,0 % (v/v) sem MMSV	2,07	0,03	69,0
2,0 % (v/v) sem MMSV	2,20	0,03	73,3
0,5% (v/v) com MMSV	11,0	0,04	275
1,0 % (v/v) com MMSV	11,27	0,07	161
2,0 % (v/v) com MMSV	11,54	0,05	230

* Meio mínimo de sais de Vogel

Fonte: Autoria própria (2018)

A atividade de lipase aumentou a medida que a concentração de óleo foi aumentada, tanto no meio sem MMSV, como no meio com MMSV, apresentando máxima atividade de 2,20 e 11,54 U/mL, respectivamente. Estes resultados evidenciam que o óleo funciona como indutor na produção de lipases, mesmo sem a presença de MMSV. Entretanto, a atividade específica não foi proporcional à quantidade de óleo adicionada. O valor mais alto alcançado foi de 275 U/mg com 0,5 % (m/v) de óleo em presença de MMSV. Os valores de atividade específica são dependentes da quantidade de proteínas totais presentes e pode-se notar que a amostra contendo 0,5 % (v/v) sem MMSV obteve alto valor de atividade específica (183 U/mg), embora sua atividade de lipase tenha sido a menor (1,83 U/mL).

Em estudos preliminares a produção de lipases foi avaliada por *B. ribis* EC-01 utilizando diversos óleos vegetais em presença de MMSV. Quando cultivado em óleo de mamona sua atividade de lipase foi 40,9 U/mL e a atividade específica foi de 191 U/mg (MESSIAS et al., 2009).



Os resultados alcançados por este trabalho sugere que o óleo de *P. edulis* é viável como fonte de carbono para produção de lipases por *B. ribis* EC-01. Estudos futuros serão realizados a fim de aumentar a atividade de produção lipase com o óleo de *P. edulis* por este fungo.

CONCLUSÕES

A extração de óleo de *Passiflora edulis* pelos métodos propostos foi eficiente e não demonstraram diferença significativa. Alto valor de atividade específica (275 U/mg) foi obtido na produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em meio contendo 0,5 % (v/v) de óleo em presença de MMSV. O óleo de *P. edulis* serve como indutor na produção desta enzima e constitui uma fonte viável e econômica de produção desta enzima, uma vez que reutiliza um resíduo da agroindústria.

REFERÊNCIAS

BIONDO, P. B. F.; * SANTOS, V. J.; MONTANHER, P. F.; JUNIOR, O. O. S., MATSUSHITA, M.; ALMEIDA, V. C.; e VISENTAINER, J. V. **Analytical Methods**. vol.7, p. 9773, 2015.

BLIGH, E.G. e DYER, W.J. A *Rapid method of total lipid extraction and purification*, **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, vol. 37, p. 911, 1959. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/o59-099#.W4ls7-hKjIU>>. Acesso em ago. 2018.

BRADFORD, M. M. A *rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, **Analytical Biochemistry**, vol.72, p. 54, 1976. Disponível em: <http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf>. Acesso em ago. 2018.

CHAU, C. F. e HUANG, Y. L. *Characterization of passion fruit seed fibres - a potential fibre source*, **Food Chemistry**, v. 85, p. 189, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814603002693>>. Acesso em ago. 2018

CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; GIESE, E. C. e DEKKER, R. F. H. *The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by Botryosphaeria sp.* **Journal of Basic Microbiology**, vol. 43, p. 385, 2003. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jobm.200310250>>. Acesso em ago. 2018.

IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**. Disponível em: <<http://www.sidra.gov.br/bda/tabela/listabl.asp>>. Acesso em jul. 2017.



JAEGER, K-E.; REETZ, M. T. *Microbial lipases form versatile tools for biotechnology*, **Trends in Biotechnology**, vol. 16, n. 9, p. 396, 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016779998011950>>. Acesso em ago. 2018.

MALACRIDA, C. R. e JORGE, N. *Yellow passion fruit seed oil (Passiflora edulis f. flavicarpa): physical and chemical characteristics*, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 55, n.1, p. 127, jan. /feb. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132012000100016>. Acesso em ago. 2018

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G; DEKKER, R. F. H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N. e 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**. vol. 45, n. 6-7, p. 426, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/6492>>. Acesso em ago. 2018.

SHARMA, R.; CHRISSTEI, Y. e BANERJEE, U.C. *Production, purification, characterization, and applications of lipases*, **Biotechnology Advances**, vol. 19, p. 627, 2001. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Production%2C-purification%2C-characterization%2C-and-of-Sharma-Chisti/391e55df3f808cb56efe90054ce06f77d0a5d4a1>. Acesso em ago. 2018.

VOGEL, H.J. *A convenient growth medium for Neurospora (medium N)*, **Microbial Genetics Bulletin**, vol. 13, p. 42, 1956.