

PRODUÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS UTILIZANDO SUBPRODUTOS DA CADEIA PRODUTIVA DO BIODIESEL DE TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum* G. MEYER)

Rosiclea Gonzaga da SILVA¹; João Vicente Braga de SOUZA ²; Júlia Ignez SALEM³; Roberto FIGLIUOLO⁴;

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientador CPCS/INPA; ³Colaborador CPCS/INPA; ⁴Colaborador CPPN/INPA

1. Introdução

Somente 20% das pequenas comunidades isoladas da Amazônia possuem acesso à energia elétrica (Castro 2005). Uma das possibilidades para geração de energia é o biodiesel, que pode ser produzido a partir de espécies vegetais oleaginosas. Especificamente no caso da Amazônia, o tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G. Meyer) apresenta potencial para ser utilizado para obtenção de biodiesel. Apesar de atualmente o biodiesel ser produzido por transesterificação via catálise básica, a pesquisa por catálise enzimática, mediada por lipases microbianas, tem aumentado sendo que, estas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de baratear e tornar mais produtivo o bioprocesso, sendo uma das abordagens a utilização de resíduos como substrato.

O Presente projeto possui o objetivo de investigar a produção de lipases fúngicas utilizando subprodutos da cadeia produtiva do biodiesel de tucumã. Especificamente pretendeu-se: a) Avaliar o isolamento de linhagens fúngicas com potencial para produzir lípases; b) Investigar a produção de lipases fúngicas em bioprocessos utilizando subprodutos do biodiesel de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G. Meyer) como substrato.

2. Material e Métodos

Os fungos utilizados neste trabalho foram isolados, dos subprodutos da cadeia de produção de biodiesel de tucumã (casca e amêndoa), pelo método de diluição sucessiva como descrito por Souza *et al.* (2005). O meio utilizado para o isolamento continha (p/v): óleo de tucumã 4%, peptona 2%, MgSO₄.7H₂O 0,07%, NaCl 0,5%, CaCl₂.2H₂O 0,01%, Agar 2% , tween 80 1,2%. Em seguida as colônias foram purificadas e identificadas, submetidos ao bioprocesso para produção de lipases como descrito por Damaso *et al.* (2008). Os bioprocessos foram realizados em frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 10g de meio de fermentação (casca de tucumã ou amêndoa de tucumã), conforme figura 1. Após 5 dias de fermentação, foi feita a extração enzimática para a quantificação da atividade lipásica pelo método titulométrico descrito por Gutarra *et al.*(2007). Uma unidade de lipase foi definida como a quantidade suficiente para produzir 1µmol de ácidos graxos por minuto nas condições experimentais.

3. Resultados e discussão

A metodologia para o isolamento dos fungos promoveu o isolamento de 17 fungos da amêndoa e 3 da casca do tucumã. Os 18 isolados identificados em nível de gênero foram: 14 *Aspergillus* spp., 3 *Penicillium* spp., e 1 *Fusarium* sp. e os outros 2 não identificados foram descritos como: *Mycelium steridium*. Estes gêneros são amplamente reconhecidos como sendo fontes adequadas para a produção de enzimas de interesse industrial, incluindo as lipases, (Oliveira 2000; Colen 2006).

Com a finalidade de realizar um pré-ensaio enzimático, os isolados foram repicados em três pontos equidistantes em um meio de cultura onde o óleo de tucumã era a principal fonte de carbono. Após o período de crescimento de sete dias foi determinado o diâmetro radial (Tabela 1). Dentre os isolados, os A₄C₂, A₁C₃ e A₂V₁, desenvolveram os maiores diâmetros sendo estes 7,6, 7,3 e 7,3, respectivamente. Todos esses isolados pertenciam ao gênero *Aspergillus*.

Tabela 1 - Diâmetro das culturas em ensaio de crescimento em placa

Isolado	Diâmetro da cultura (cm)	Isolado	Diâmetro da cultura (cm)
<i>Aspergillus</i> A ₁ Act	4,2 ± 0,3	<i>Aspergillus</i> A ₂ P	6,7 ± 0,5
<i>Aspergillus</i> A ₁ B	3,1 ± 0,1	<i>Aspergillus</i> A ₂ V ₁	7,3 ± 0,8
<i>Fusarium</i> A ₁ C ₁	3,9 ± 0,2	<i>Aspergillus</i> A ₂ V ₂	6,0 ± 0
<i>Aspergillus</i> A ₁ C ₃	7,3 ± 0,3	<i>Aspergillus</i> A ₃ G	1,6 ± 0,2
<i>Aspergillus</i> A ₁ P	3,4 ± 0,1	<i>Aspergillus</i> A ₄ C ₁	5,7 ± 0,6
<i>Penicillium</i> A ₁ V ₃	4,7 ± 0,2	<i>Aspergillus</i> A ₄ C ₂	7,6 ± 0,1
<i>Penicillium</i> A ₁ Verm	3,1 ± 0,2	<i>Aspergillus</i> A ₄ C ₃	4,1 ± 0
<i>Aspergillus</i> A ₂ B ₁	4,1 ± 0,3	<i>M. steridium</i> C ₂ B ₁	3,7 ± 1,6
<i>M. steridium</i> A ₂ B ₂	4,0 ± 0,6	<i>Aspergillus</i> C ₄ V ₁	4,3 ± 0,7
<i>Penicillium</i> A ₂ G	1,9 ± 0,1	<i>Aspergillus</i> C ₄ V ₂	3,1 ± 0,1

Na Tabela 2 podemos observar a produção de lipase utilizando subprodutos do biodiesel de tucumã. No bioprocesso as linhagens foram submetidas à fermentação em estado sólido (FES) em casca e amêndoa do tucumã por 120h. De forma geral, os bioprocessos não produziram quantidades significativas de lípases, quando comparamos com resultados presentes na literatura (Pastore *et al.* 2003; Coradi *et al.* 2010). Isto pode ser explicado devido à presença de celulose e amido nos substratos casca e amêndoa, estas podem ter causado efeito supressor metabólico no anabolismo de lípases. Outro problema é que segundo Colen (2006) é entre 60 a 72h que são observados os maiores títulos de lípases e nossos experimentos tiveram como tempo de análise 120 h. Apenas 7 e 4 fungos produziram lípases utilizando a casca e a amêndoa como substrato, respectivamente. Os títulos de lípases variaram entre 4 - 60 UI/L. Bons produtores de lípases, em bioprocessos bem conduzidos, produzem 22000 UI/L de lípases. No caso dos fungos filamentosos a produção de lipase varia de acordo com a cepa, de acordo com o meio de cultura e com as condições de cultivo (Colen 2006).

TABELA 2 - Produção de lipase utilizando subprodutos do biodiesel de tucumã.

Bioprocesso com a Casca		Bioprocesso com a amêndoa	
Isolado	Atividade lipásica (UI/L)	Isolado	Atividade lipásica (UI/L)
<i>Aspergillus</i> A ₁ Act	30	<i>Aspergillus</i> A ₁ Act	--
<i>Aspergillus</i> A ₁ B	60	<i>Aspergillus</i> A ₁ B	4
<i>Fusarium</i> A ₁ C ₁	--	<i>Fusarium</i> A ₁ C ₁	50
<i>Aspergillus</i> A ₁ C ₃	--	<i>Aspergillus</i> A ₁ C ₃	--
<i>Aspergillus</i> A ₁ P	20	<i>Aspergillus</i> A ₁ P	--
<i>Penicillium</i> A ₁ V ₃	4	<i>Penicillium</i> A ₁ V ₃	--
<i>Penicillium</i> A ₁ Verm	10	<i>Penicillium</i> A ₁ Verm	--
<i>Aspergillus</i> A ₂ B ₁	--	<i>Aspergillus</i> A ₂ B ₁	--
<i>M. steridium</i> A ₂ B ₂	--	<i>M. steridium</i> A ₂ B ₂	--
<i>Penicillium</i> A ₂ G	--	<i>Penicillium</i> A ₂ G	--
<i>Aspergillus</i> A ₂ P	--	<i>Aspergillus</i> A ₂ P	--
<i>Aspergillus</i> A ₂ V ₁	8	<i>Aspergillus</i> A ₂ V ₁	20
<i>Aspergillus</i> A ₂ V ₂	60	<i>Aspergillus</i> A ₂ V ₂	--
<i>Aspergillus</i> A ₃ G	2	<i>Aspergillus</i> A ₃ G	--
<i>Aspergillus</i> A ₄ C ₁	--	<i>Aspergillus</i> A ₄ C ₁	--
<i>Aspergillus</i> A ₄ C ₂	--	<i>Aspergillus</i> A ₄ C ₂	--
<i>Aspergillus</i> A ₄ C ₃	--	<i>Aspergillus</i> A ₄ C ₃	--
<i>M. steridium</i> C ₂ B ₁	--	<i>M. steridium</i> C ₂ B ₁	--
<i>Aspergillus</i> C ₄ V ₁	--	<i>Aspergillus</i> C ₄ V ₁	4
<i>Aspergillus</i> C ₄ V ₂	--	<i>Aspergillus</i> C ₄ V ₂	--



Fonte: Autor (2011)

Figura 1 – Bioprocesso da fermentação em estado sólido (FES) dos fungos isolados da casca e da amêndoa

4. Conclusão

- a. A metodologia de isolamento permitiu o isolamento de 20 fungos lipofílicos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp e *Fusarium* sp.;
- b. Os substratos casca e amêndoa, nas condições experimentais, não demonstraram-se adequados para produção de lípases pelos isolados.

5. Referências

- Castro, J.C.2005. Atendimento Energético a Pequenas Comunidades Isoladas: Barreiras e Possibilidades. *T&C Amazônia*, 6(1): 30-35.
- Colen, G. 2006. Isolamento e Seleção de Fungos Filamentosos produtores de Lípase. Tese (Doutorado em Ciências de Alimento)-Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte.
- Coradi, G. V.; Oliveira, B. H.; Neto, P. O.; Lima, V. M. G. 2010. Utilização de Resíduos Agroindustriais para Produção de Lipases por Fungos Filamentosos. *Faculdade da Ciências e Letras- FAPESP*, São Paulo.
- Damaso, M. C. T.; Passianoto, M. A.; Freitas, S. C.; Freire, D. M. G.; Lago,R. C. A.; Couri, S. 2008. Utilization of Agroindustrial Residues for Lipase Production by Solid-state Fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(4): 676-680.
- Gutarra, M.L.E.; Godoy, M.G.; Castilho, L.R.; Freire, D.M.G. 2007. Inoculum Strategies for *Penicillium Simplicissimum* Lipase Production by Solid-state Fermentation using a Residue from the Babassu oil Industry. *J.Chem. Technology Biotechnol*, 82(1):313–318.
- Oliveira, D.T.M. 2000. Lipase extracelular de fungo filamentosos: Isolamento e caracterização parciais. Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos. Faculdade de Farmácia da UFMG. Belo Horizonte.
- Pastore, G. M.; Costa, V. S. R.; Koblitz, M. G. B. 2003. Purificação Parcial e Caracterização Bioquímica de Lipase Extracelular Produzida por Nova Linhagem de *Rhizopus* sp,. *Ciências Tecnologia de Alimentos*, 23 (2).
- Souza, J. V. B.; Silva, E. S.; Silva, F. T.; Paiva, T. C. B. 2005. Fungal Treatment of a Delignification Effluent from a Nitrocellulose Industry. *Bioresource Technology*, 96(1): 1936–1942.