

MICRO-ORGANISMOS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE *Maximiliana maripa* (Aublet) Drude (inajá) PARA BIODIESEL

Marisa Paula de ANDRADE¹
Edelcílio Marques BARBOSA²
Ires Paula de Andrade MIRANDA³

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientador CBIO/INPA; ³Co-Orientador CBIO/INPA

INTRODUÇÃO

A produção de biodiesel a partir de oleaginosas é uma importante estratégia para o uso sustentável da biomassa, compreendida como principal fonte de matérias primas para geração de combustível renovável. No Estado do Amazonas, estão distribuídas várias espécies de palmeiras oleaginosas nativas ainda pouco exploradas, mas com potencial para produção de agroenergia. Potencial este, que pode transformar a região em um pólo de produção de biocombustíveis a partir, principalmente, das produtoras de sementes com elevado teor energético das quais se podem extrair óleos vegetais de composição química e propriedades físico-químicas diversas (Balick 1988; Galeano 1992; Kahn e De Granville 1992; Miranda *et al.* 2001 2008). O objetivo do presente trabalho foi avaliar os micro-organismos mantidos em coleções quanto as suas atividades enzimáticas utilizando o óleo de inajá. O propósito foi colaborar na minimização da principal desvantagem do uso de enzimas, devido ao alto custo e principalmente na utilização de óleos vegetais de espécies nativas que não competem por uma aplicação alimentar e os seus substratos para processos que visam provimento de bioenergia. A metodologia adotou as análises do tipo: qualitativo e semiquantitativo, verificando-se que 12 isolados bacterianos apresentaram a capacidade de produzir enzima lipase hidrolítica extracelulares utilizando o óleo de inajá com ótimos índices de atividade da lipase.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório da UFAM (Universidade Federal do Amazonas). Para este estudo foram disponibilizadas 44 isolados bacterianos para atuarem como fontes de lipase. Destes, sete fazem parte da Coleção de Microrganismos do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) e os demais são provenientes da Coleção de Microrganismos do Solo do Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA). Estes micro-organismos foram pré-isolados de solos e raízes de ambiente agrícola e florestal Inicialmente, as bactérias foram reativadas a partir de seus estoques em glicerol (60%), cada bactéria foi inoculada em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio basal composto por Glicose (1,0%), extrato de levedura (0,2%), KH_2PO_4 (0,5%), MgSO_4 (0,2%), CaCl_2 (0,1%), (ph 8,0) e incubada a temperatura de 30 °C, 120 rpm de agitação por até 72 horas. 10 µL de cada inóculo foram transferidos para placas de Petri contendo meio basal sólido (adicionado com ágar 1,8%) e incubadas nas mesmas condições de tempo e temperatura. As colônias foram isoladas pela técnica de esgotamento por estrias cruzadas sendo posteriormente incubadas em estufa a 37 °C por até 72h. Para a esterilização, os meios foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos (Willerding *et al.* 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram repicados 44 isolados bacterianos. Somente aqueles que apresentaram crescimento de colônias em até 72 horas em meio basal (Figura 1) foram considerados ativos e, portanto aptos ao teste de atividade de lipase. Apenas quatro isolados foram rejeitados para os testes posteriores em função do não crescimento em meio basal ou por apresentarem crescimento muito lento. Portanto, 36 isolados foram efetivamente testados quanto à atividade lipolítica em meio de cultura sólida. Desse total, 12 isolados (27,2%) apresentaram atividade positiva nas condições testadas, ou seja, promoveu a ação enzimática em meio de cultura sólido, contendo o óleo da amêndoa de inajá como substrato.

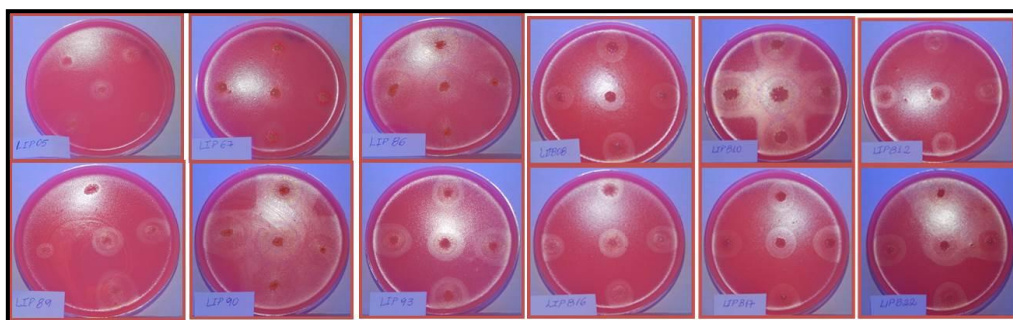


Figura 1: Isolados bacterianos reativados.

O meio de cultura contendo triacilglicerídeo e corante rodamina B apresentou-se opaco e com uma coloração rosa. A utilização de corante facilita as visualizações dos micro-organismos produtores de lipase (Figura 2). A hidrólise do substrato pela enzima produz um ácido graxo que ao reagir com o corante diferencia as colônias lipolíticas daquelas que crescem no meio e não degradam o lipídeo. Portanto, não formam halo e utilizam outras fontes de carbono contidas no meio para o seu metabolismo. O corante promove além do halo uma reação de fluorescência nas culturas de lipases positivas quando expostas à radiação de luz ultravioleta (Kouker e Jaeger 1987).

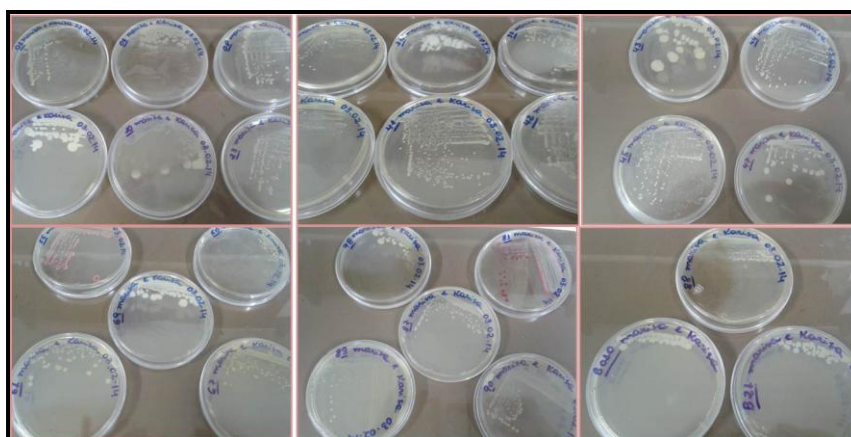


Figura 2: Formação de halo ao redor das colônias bacterianas.

Isto indica também que esta lipases provavelmente tem boa afinidade por ácidos graxos saturados, de cadeia longa, como o ácido graxo láurico, principal constituinte da composição química do óleo utilizado neste estudo (Dados não publicados). Este registro está em acordo com dados da literatura que mostram que lipases produzidas por diferentes linhagens hidrolisam preferencialmente triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia longa (Pastore *et al.* 2003). Na literatura, diversos trabalhos em diferentes tempos citam variações de 1 hora, passando por 24, 72 e até 120 horas de ensaio para a análise da atividade da lipase (Oliveira *et al.* 2006 e Willerding *et al.* 2011). Para o presente trabalho, a determinação do IAL foi de 72 horas, concordando com os dados da literatura que citam o pico de produção da lipase em 72 horas para as bactérias (Sene *et al.* 2002). A Tabela 1 apresenta para os 12 isolados lipase positivos o índice de ativação enzimática médio, nota-se uma classificação que revela os diferentes níveis de atividade após 72 horas, levando-se em conta como referência a estirpe *Bacillus subtilis* atcc 6633 (Stamford *et al.* 1998), possuindo um índice enzimático em meio de cultura sólido específico para lipase em 1,80.

Para o presente trabalho, a determinação do IAL foi de 72 horas, pois a literatura cita que as bactérias apresentam o pico de produção de lipase em 72 horas (Sene *et al.* 2002).

A Tabela 1 apresenta para os 12 isolados lipase positivos o índice de ativação enzimática médio, nota-se uma classificação que revela os diferentes níveis de atividade após 72 horas e leva em conta como referência, a estirpe *Bacillus subtilis* atcc 6633 (Stamford *et al.* 1998), que possui o índice enzimático em meio de cultura sólido específico para lipase em 1,80.

Tabela 1. Índices de ativação de lipase (IAL) dos isolados selecionados em 30 °C a 72 horas em meio de cultura com óleo de inajá (média de cinco repetições).

Linhagens	halo 1	colônia 1	halo 2	colônia 2	halo 3	colônia 3	halo 4	colônia 4	halo 5	colônia 5	Φ halo	Φ <u>colonia</u>	IAL
LIP 05	1,5	0,8	1,2	0,7	1,5	0,5	1,5	0,5	2,5	0,5	1,64	0,6	2,73
LIP 67	2,2	0,6	2,2	0,5	2,4	0,6	2,5	0,5	2	0,6	2,26	0,56	4,04
LIP 86	2,5	0,6	2,5	0,8	2,5	0,8	2,5	0,5	2,2	0,4	2,44	0,62	3,94
LIP 89	1,7	0,8	1,1	0,7	1,7	0,7	1,7	0,8	2	0,7	1,64	0,74	2,22
LIP 90	3,9	0,7	3	0,8	3	0,7	3,9	0,5	3,9	0,5	3,54	0,64	5,53
LIP 93	2	0,6	2	0,6	2	0,6	2,4	0,6	2,4	0,7	2,16	0,62	3,48
LIP B-08	1,8	0,7	1,8	0,7	1,6	0,6	1,7	0,6	1,8	0,7	1,74	0,66	2,64
LIP B-10	3,5	0,8	3,5	0,7	3,5	1	3,3	0,7	3,5	0,8	3,46	0,8	4,33
LIP B-12	1,6	0,3	1,6	0,3	1,6	0,3	1,8	0,3	1,6	0,3	1,64	0,3	5,47
LIP B-16	1,6	0,3	1,6	0,3	1,7	0,3	1,8	0,3	1,6	0,3	1,66	0,3	5,53
LIP B-17	1,8	0,6	1,8	0,6	1,8	0,6	2,4	0,7	1,8	0,7	1,92	0,64	3,00
LIP B-22	2	0,5	3	0,5	3,5	0,5	3	0,5	2	0,5	2,7	0,5	5,40

CONCLUSÃO

Os isolados bacterianos mostraram capacidade em produzir enzima lipase hidrolítica extracelular. Todos os isolados apresentaram ótimos índices de atividade da lipase LIP05 (IAL=2,73), LIP67 (IAL=4,04), LIP86 (IAL=3,94), LIP89 (IAL=2,22), LIP90 (IAL=5,53), LIP93 (IAL=3,48), LIPB08 (IAL=2,64), LIPB10 (IAL=4,33), LIPB12 (IAL=5,47), LIPB16 (IAL=5,53), LIPB17 (IAL=3,00), LIPB22 (IAL=5,40).

REFERÊNCIAS

- Balick, M.J. 1988. The use of palms by the Apinayé and Guajajara indians of northeastern Brazil. *Adv. Econ. Bot.* 6:65-90.
- Galeano, G. 1992. *Las palmas de la region de Araracuara*. TROPENBOS, Colômbia. 180 p.
- Kahn, F.; De Granville, J. 1992. *Palms in forest ecosystems of Amazonia*. U.S.A, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 226p.
- Kouker, G.; Jaeger, K.E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 211-213.
- Miranda, I.P.A.; Rabelo, A.; Bueno, C.R.; Barbosa, E.M.; Ribeiro, M.N.S. 2001. *Frutos de palmeiras da Amazônia*. MCT/INPA. Manaus. 120p.
- Miranda, I.P.A.; Rabelo, A. 2008. *Guia de Identificação das palmeiras de Porto Trombetas-PA*. EDUA/INPA/MRN. Manaus, 365p. ilustr.
- Sene, C.P.; Marques, P.D.; Ferro, P.R.S.; Pinheiro, D.M.; Pastore, C.M. 2002. *Seleção de microrganismos produtores de lipase alcalina*. *Enzitec 2002*, Brasília, Livro de Resumo, p. 72-73.
- Stamford, T.L.M.; Araujo, J.M.; Stamford, N.P. 1998. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupe (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciênc.Tecnol. Aliment.*, 382-385.
- Willering, A.L.; Oliveira, L.A.; Moreira, F.W.; Germano, M.G.; Chagas Jr., A.F. 2011. Lipase Activity among Bacteria Isolated from Amazonian Soils. *Enzyme Research*, 1-5.