

OBTENÇÃO DE LIPASES A PARTIR DE FUNGOS ASSOCIADOS A CAULES E FOLHAS DE MANDIOCA

Beatriz de Oliveira Perossi¹, Andreia de Araújo Morandim-Giannetti¹

^{1,3} Departamento de Engenharia Química, Centro Universitário FEI

beatrizperossi@hotmail.com e preamorandim@fei.edu.br

Resumo: A busca por processos biocatalíticos tem crescido significativamente em diversos setores como, por exemplo, o de biocombustíveis. Neste contexto, fungos têm se mostrado promissores na produção de enzimas as lipases, utilizadas na produção de biodiesel. Assim, neste trabalho, está sendo realizado um estudo da produção de lipase por fungos endofíticos obtidos a partir de caules e folhas de mandioca sendo que, até o momento, verificou-se que a espécie “CA9” apresentou maior atividade com relação a produção de lipase.

1. Introdução

A emissão de gases que causam o efeito estufa tem crescido significativamente e, assim, ações têm sido tomadas para reduzir a emissão de gases, como a utilização e/ou estudo de obtenção de biocombustíveis como o biodiesel [1].

Esse biocombustível é definido como um éster alquílico ou metílico de ácidos graxos, sendo possível, durante a obtenção do mesmo, a utilização de diversos óleos vegetais bem como a partir de resíduos como, por exemplo: óleo usado de cozinha, sebo bovino, gordura animal, entre outros [2].

Dentre as metodologias de transesterificação para a produção do biodiesel, a catálise enzimática tem despertado o interesse de pesquisadores pela elevada efetividade de reação, sua possibilidade de aplicação em condições mais amenas de reação, e menor produção de subprodutos.

Contudo, o custo do processo ainda é um problema significativo. Assim, pesquisas têm sido realizadas na busca de novas fontes de lipases visando a redução do custo de obtenção da mesma, e novos suportes para a imobilização que possibilitem o reuso por diversos ciclos sem a perda ou redução significativa da atividade [3].

As lipases podem ser obtidas a partir de microrganismos, animais e, vegetais porém, devido a vários fatores como, o rápido crescimento, elevada produção e alto rendimento, microrganismos como diversos fungos têm se mostrado a fonte mais promissora para obtenção de enzimas destacando-se: *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus*, *Candida antarctica* B, *Rhizomocur miehei*, entre outros.

Assim, a aplicação de fungos em processos de obtenção de biocatalisadores como as lipases, e de compostos ativos, como os alcaloides, ácidos graxos, amidas, etc., têm crescido significativamente devido ao elevado número de espécies (aproximadamente 4.000.000 espécies) [4], o que justifica o desenvolvimento do presente trabalho, que visa a avaliação da produção de lipases por fungos associados a caules e folhas de mandioca.

2. Materiais e Métodos

Durante o desenvolvimento do presente projeto, inicialmente foi avaliada a produção de lipases por fungos endofíticos associados a caules de mandioca isolados e identificados durante o desenvolvimento do projeto FAPESP 2015/19273-2. Para isso, os mesmos foram cultivados em meio batata dextrose agar (BDA) e, após o crescimento, submetidos ao processo de extração enzimática.

Essa extração enzimática foi realizada pela trituração do fungo na presença de nitrogênio líquido, seguida pela adição de polivilpolipirrolidona (PVPP) e adição de 50 mL de tampão acetato pH 7,0. Após a obtenção do extrato, o meio foi filtrado utilizando-se gaze e, centrifugado a 4000 rpm durante 40 min. Todos os extratos foram avaliados para a seleção dos fungos produtores de lipase através da determinação da atividade de lipase bem como determinação da concentração proteica.

A avaliação da produção de lipases pelos fungos foi realizada via análise qualitativa e quantitativa. Para isso, durante a análise qualitativa, os mesmos foram cultivados em placas de petri utilizando como meio de cultura uma mistura batata dextrose ágar (8 g/L), cloreto de sódio (4 g/L), azeite de oliva (31,25 mL/L), e rodamina (10 mL/L). Ajustou-se o pH do meio para 7 e, os fungos foram incubados durante 3 dias. Após esse período, a produção de lipase foi identificada pelo aparecimento de um halo fluorescente em presença de luz UV devido a formação de um complexo entre os ácidos graxos livres e rodamina [5].

Após a seleção dos fungos produtores de lipase, durante a etapa de avaliação da produção de lipases quantitativa, utilizou-se a metodologia descrita por Li et al. (2019) [6], que avalia a atividade utilizando-se como reagentes o *p*-nitrofenil palmitato. Assim, 915 µl de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7.0) foram misturados com 80 µl de *p*-nitrofenil palmitato 5mM dissolvidos em acetonitrila/metanol (1:1). A essa mistura foram adicionados 5 µl de extrato enzimático e a reação processou-se a 30°C durante 10 min. Após esse período, foram adicionados a mistura 500 µL de ácido tricloroacético 20% (m/v) e, posteriormente, 500 µL de carbonato de sódio 20% (m/v). Então, a absorbância foi avaliada a 405 nm.

3. Resultados e Discussões

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, inicialmente foi realizada a análise qualitativa da produção de lipase para seleção inicial dos fungos produtores dessa enzima. Dessa forma, foram avaliados 14 fungos diferentes isolados previamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Fungos utilizados durante o desenvolvimento do trabalho

Fungo	Identificação
<i>Microdochium lycopodium</i>	CA1
<i>Colletotrichum</i> sp.	CA2
<i>Cladosporium</i> sp.	CA3
<i>Alternaria</i> sp.	CA5
<i>Phomopsis</i> sp.	CA7
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	CA8
<i>Diaporthe endophytica</i>	CA9
<i>Vouchered mycorrhizae</i>	CA10
<i>Phanerochaete australis</i>	CA11
<i>Diaporthe caatingaensis</i>	CA12
<i>Stenocarpella maydis</i>	CA13
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	CA14
<i>Sordariomycetes</i> sp.	CA15
<i>Phanerochaetaceae</i> sp.	CA17

A avaliação foi realizada através das imagens em que foi verificado que as espécies CA5, CA9, CA12, CA14 e CA15 obtiveram maior desempenho na produção de lipase. Essa produção pode ser evidenciada pela presença de um halo rosa mais escuro ao redor dos fungos, exibidos na figura 1.



Figura 1 – Espécies que apresentaram maior atividade de lipase.

Além da análise qualitativa, foi realizada uma análise quantitativa dos extratos obtidos a partir dos fungos submetidos ao crescimento em meio BDA. Após a extração enzimática dos fungos, foi possível comparar o desempenho das espécies pela absorbância, em que foi verificado que os extratos obtidos a partir de CA9, CA13, CA14 e CA17 indicaram maior atividade enzimática levando-se em consideração a produção de lipase sendo a maior atividade identificada para os fungos CA9. Tais resultados podem ser evidenciados na tabela 2 e figura 2.

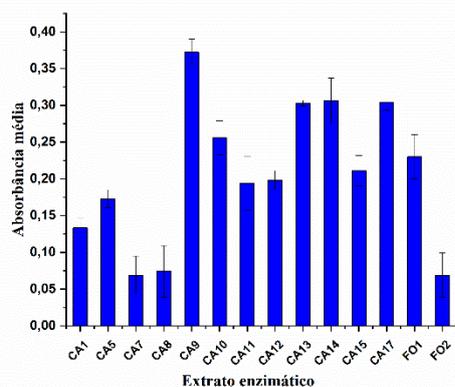


Figura 2 - Avaliação da produção de lipase pelos fungos pela absorbância

Tabela 2 - Dados de absorbância obtidos durante a análise quantitativa de produção de lipase.

Extrato	Absorbâncias				Média	Desvio padrão
	A1	A2	A _{branco}			
CA1	0,139	0,157	0,015		0,133	0,013
CA5	0,187	0,170	0,006		0,173	0,012
CA7	0,087	0,051	0,000		0,069	0,026
CA8	0,049	0,098	0,000		0,074	0,035
CA9	0,395	0,369	0,010		0,372	0,018
CA10	0,247	0,280	0,008		0,256	0,023
CA11	0,172	0,225	0,005		0,194	0,037
CA12	0,189	0,207	0,000		0,198	0,013
CA13	0,300	0,305	0,000		0,303	0,004
CA14	0,340	0,296	0,012		0,306	0,031
CA15	0,212	0,209	0,000		0,211	0,021
CA17	0,305	0,321	0,009		0,304	0,011
FO1	0,252	0,210	0,001		0,230	0,030
FO2	0,047	0,090	0,000		0,069	0,030

Levando-se em consideração os resultados preliminares obtidos via análise qualitativa e quantitativa relacionada a produção de lipases, durante a próxima etapa será modificado o meio de crescimento do fungo CA9 (*Diaporthe endophytica*) visando o aumento da produtividade de lipase e, também, uma pré purificação do extrato bioativo sendo avaliada a atividade enzimática após a realização de cada etapa.

4. Conclusões

A comparação das análises dos resultados obtidos mostra que houve maior desempenho na produção de lipase pelo fungo CA9 (*Diaporthe endophytica*). Dessa forma, durante a próxima etapa, será realizado o estudo da enzima de interesse para a otimização da produção através da modificação do meio de cultura visando o aumento de produtividade por esse fungo. Também será realizada uma pré purificação do extrato enzimático visando o enriquecimento nesta enzima.

5. Referências

- [1] Jayaraman, J. et al. *Renewable Energy*, **145** (2020) 399-407.
- [2] Nematian, T.; Salehi, Z.; Shakeri, A. *Renewable Energy*, **146** (2020) 1796-1804.
- [3] Zhang, H. et al. *Renewable Energy*, **145** (2020) 1246-1254.
- [4] Savidov, N. et al. *Steroids*, **140** (2018) 114-124.
- [5] Satti, S.M. et al. *Polymer Degradation and Stability*, **160** (2019) 1-13.
- [6] LI, L. et al. *Enzyme and Microbial Technology*, **126** (2019) 41-49.

Agradecimentos

À instituição Centro Universitário FEI pela bolsa concedida e financiamento do presente trabalho.

¹ Aluno de IC do Centro Universitário FEI. Projeto com vigência de 31/07/20 até 30/11/20.