

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL A PARTIR DE FUNGOS ISOLADOS DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO

Aline Santos e Santos¹; Sandra A. Assis²; Íngara São Paulo Barreto³

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e-mail: linemania@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)
3. Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana

PALAVRAS CHAVE: Quitinase, b-glicosidase, celulase, semi-árido.

INTRODUÇÃO

Considerando que o progresso tecnológico apresenta caráter acumulativo e multiplicador, acredita-se que o uso industrial de produtos obtidos de fungos tenderá a aumentar no futuro, tanto pelas aplicações já existentes quanto pelos novos mercados buscados pelas empresas. A atividade de pesquisa em diversidade microbiana, e, conseqüentemente, a exploração tecnológica dos recursos microbianos, é ainda bastante limitada no Brasil, e inexpressível na região Semi-árida brasileira (OLIVEIRA, 2007). Esta região ocupa uma área de aproximadamente 8% do território nacional, onde predomina o Bioma Caatinga (PPBio, 2006). Assim, justifica-se a busca de novas fontes para enzimas de origem microbiana, o que, notadamente, contribui para o conhecimento da biodiversidade, além de transformar as pesquisas realizadas nas universidades em produtos que beneficiem a economia baiana.

Quitinases, celulases, e β -glicosidase (laminarinase, EC 3.2.1.21) são enzimas com uma ampla variedade de aplicações biotecnológicas. Por exemplo, utilizando-se preparações de celulose comercial com laminarinase, pode-se obter aumento da taxa de hidrólise da celulose e produção de etanol. Ainda em relação à laminarinase, têm sido extensivamente estudada por sua habilidade de produzir compostos aromáticos (WALLECHA e SAROJ, 2003).

Este estudo teve como objetivo obter as enzimas quitinases, b-glicosidases e celulases, e caracterizá-las, avaliando sua termoestabilidade.

METODOLOGIA

As leveduras foram isoladas do semi-árido baiano segundo técnica descrita por Nakayama (1981) e por Morais et al. (2005) e foram depositadas na Coleção de Cultura da Bahia. Utilizou-se a *Pseudozyma sp* (CCMB 300). Preservação e manutenção dos isolados: os isolados de leveduras foram mantidos em ultrafreezer a -80°C . O crioprotetor utilizado será o glicerol a 10% em água estéril.

Quitinase: Utilizou-se o método de açúcares redutores (DNS). A determinação da atividade de quinase foi verificada empregando-se quitina 1,0% em tampão fosfato de sódio, pH 7,0, como substrato. A mistura da reação foi composta de 0,5 mL do extrato enzimático e 0,5 mL do substrato. A solução foi mantida em banho de aquecimento a 50°C por 30 minutos. Em seguida adicionou-se 1 ml de DNS e levou-se a banho-maria a 95°C por 15 minutos. A mistura foi resfriada acrescentando-se 10 ml de água destilada. A atividade foi lida em espectrofotômetro (UV/VIS modelo Varian) a 540 nm.

β -Glicosidase (laminarinase): Utilizou-se o método de açúcares redutores (DNS). A determinação da atividade de glicosidase foi verificada empregando-se laminarina 0,1% em tampão citrato, pH 6,2, como substrato. A mistura da reação foi composta de 0,2 mL do extrato enzimático e 0,2 mL do substrato. A solução foi mantida em banho de aquecimento a 50°C por 30 minutos. Em seguida adicionou-se 0,4 ml de DNS e levou-se a banho-maria a 98°C por 15 minutos. A mistura foi resfriada acrescentando-se 4 ml de água destilada. A atividade foi lida em espectrofotômetro (UV/VIS modelo Varian) a 540 nm.

Celulase: Utilizou-se o método de açúcares redutores (DNS). A determinação da atividade de celulase foi verificada empregando-se CMC (carboximetilcelulose – 0,5% em tampão acetato, pH 5,0) como substrato. A mistura da reação foi composta de 0,5 mL do extrato enzimático e 0,5 mL do substrato. A solução foi mantida em banho de aquecimento a 50°C por 30 minutos. Em seguida

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

adicionou-se 0,5 ml de DNS e levou-se a banho-maria a 98°C por 15 minutos. A mistura foi resfriada acrescentando-se 5 ml de água destilada. A atividade foi lida em espectrofotômetro (UV/VIS modelo Varian) a 540 nm.

Termoestabilidade: As amostras foram incubadas em banho-maria em diferentes temperaturas (50 a 90 °C) e tempos (10 a 60 minutos), com intervalos fixos de 10°C e 10 minutos. Em seguida a atividade foi determinada e lida em espectrofotômetro a 540nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A termoestabilidade das enzimas celulase, β -glicosidase e quitinase, provenientes da *Pseudozyma sp* (CCMB 300)., foi observada para as temperaturas 50, 60, 70, 80 e 90°C, nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos (Figuras 01, 02 e 03).

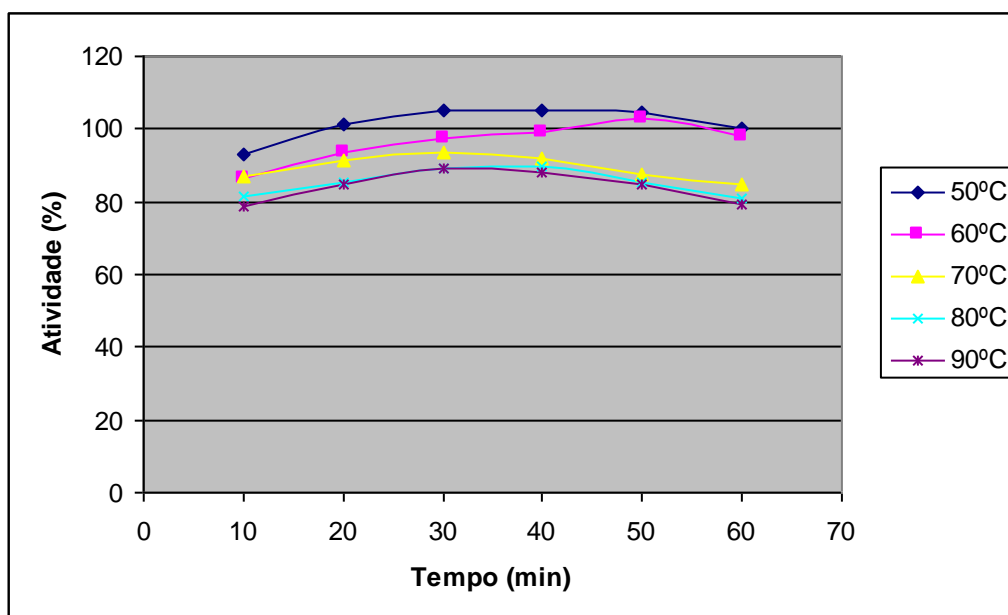


Figura 01: Termoestabilidade da enzima celulase, proveniente da *Pseudozyma sp*, em diferentes temperaturas.

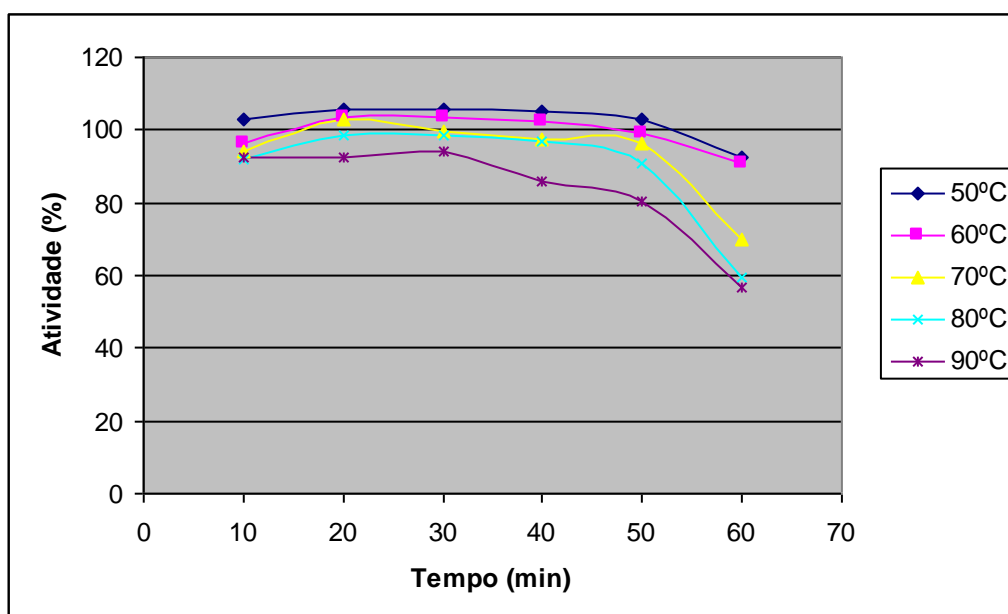


Figura 02: Termoestabilidade da enzima β -glicosidase, proveniente da *Pseudozyma sp*, em diferentes temperaturas.

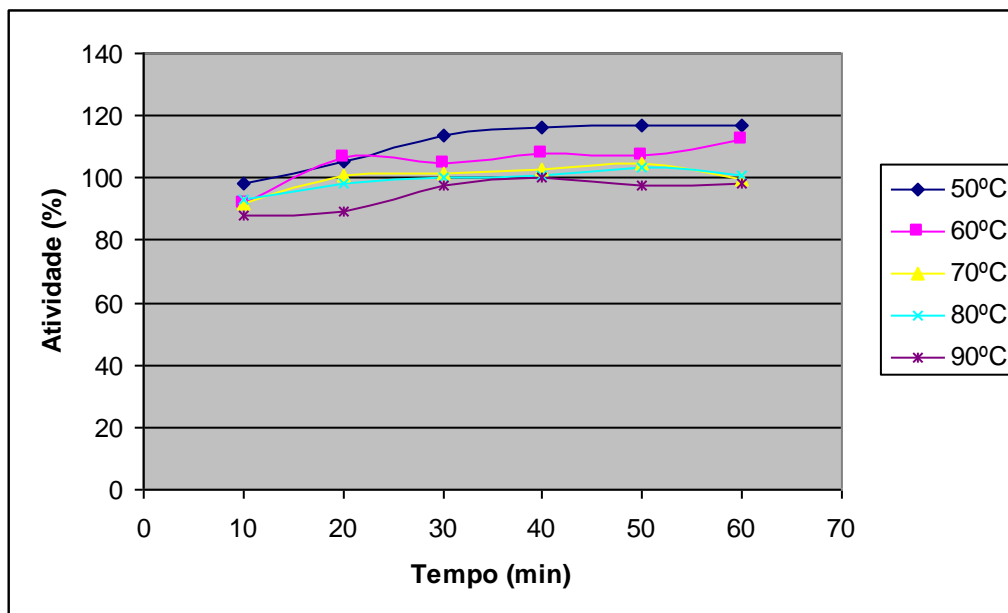


Figura 03: Termostabilidade da enzima quitinase, proveniente da *Pseudozyma sp*, em diferentes temperaturas.

Nos ensaios de termostabilidade da celulase, foi possível observar que após 10 minutos de incubação, todas as atividades enzimáticas diminuíram de valor em todas as temperaturas, tendo um aumento significativo na faixa de 30-40 minutos, e tornando a decair no tempo de 60 minutos. Verificou-se também que a sua maior atividade se deu na temperatura de 50°C, e a menor na temperatura de 90°, com uma perda de apenas 20% de sua atividade.

Nos ensaios de termostabilidade da β -glicosidase, foi possível observar que sua atividade manteve-se acima de 90% nas temperaturas de 50, 60, 70 e 80°C, nos tempos de 10 a 50 minutos. Apresentou uma queda significativa de atividade apenas quando submetida às temperaturas de 70, 80 e 90°C, no tempo de 60 minutos, sendo uma perda de 30% em 70°C, e 50% em 80 e 90°. Sendo assim, observa-se que a β -glicosidase possui sua maior atividade nas temperaturas de 50 e 60°C, e a menor na temperatura de 90°.

Nos ensaios de termostabilidade da quitinase, foi possível observar que há um aumento de sua atividade com o decorrer do tempo, e uma leve diminuição com o aumento da temperatura, contudo permanece com praticamente 100% de sua atividade, tendo apenas uma perda de 2% na temperatura de 90°C, no tempo de 60 minutos.

Os resultados obtidos também permitiram inferir que as enzimas celulase, β -glicosidase e quitinase, são bastante termostáveis, e esse fato caracteriza uma vantagem na utilização dessas enzimas a nível industrial, visto que a depender do processo biotecnológico, é preciso adequar a temperatura de forma a evitar perdas e contaminação, e sendo a enzima termostável, esse processo torna-se facilitado, o que assegura uma produção elevada a baixos custos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

A realização deste estudo permitiu determinar experimentalmente a termostabilidade das enzimas β -glicosidase, celulase e quitinase, constatando-se que estas enzimas são bastante termostáveis, tendo a celulase uma atividade superior na temperatura de 50°C, e inferior em 90°; a β -glicosidase demonstrou sua maior atividade nas temperaturas de 50 e 60°C, e a menor na temperatura de 90°; a quitinase apresentou-se termostável em todas as temperaturas.

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

REFERÊNCIAS

OLIVEIRA, Valéria Maia de; SETTE, Lara Durães; GARBOGGINI, Fabiana Fantinatti. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Multiciência**. Out, 2007.

PPBio. Disponível em: <<http://www.uefs.br/ppbio/home.htm>>. Acesso em: 22 fev. 2006.

WALLECHA AND SAROJ, 2003. **Purification and characterization of two h-glucosidases from a thermo-tolerant yeast Pichia etchellsii**. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1649, 74 84, 2003.