

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

OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DA ENZIMA QUITINASE PRODUZIDA PELO FUNGO *MONILIOPTHORA PERNICIOSA* CAUSADOR DA VASSOURA-DE-BRUXA

Íngara São Paulo Barretto¹; Sandra Aparecida de Assis²; Gildomar Lima Valasques Júnior³; Aline Santos e Santos⁴

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ingarakeisle@yahoo.com.br
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana
3. Mestrando em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana
4. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana

PALAVRAS-CHAVE: *Moniliophthora perniciosa*; Otimização da obtenção de quitinase; Quitinase

INTRODUÇÃO

Durante a última década as enzimas quitinolíticas têm ganhado importância por suas aplicações biotecnológicas. Particularmente, quitinases são utilizadas na agricultura para o controle de fitopatógenos. A enzima pode ser utilizada diretamente no controle biológico de microorganismos patogênicos e insetos, para produção de biopesticidas, produção de quitoooligosacarídeos (PATIL, GHORMADE, DESHPANDE, 2000).

As quitinases fazem parte das Famílias 18 e 19 das glicohidrolases. A Família 19 é altamente conservada e abrange somente quitinases de plantas, enquanto que a Família 18 é diversa e contém as enzimas de plantas, bactérias e fungos (PERRAKIS et al., 1994).

Em bactérias, as quitinases desempenham funções de nutrição e parasitismo enquanto que em fungos, protozoários, invertebrados elas estão também são importantes na morfogênese. Quitinases estão envolvidas no mecanismo de defesa de plantas e animais vertebrados (PATIL, GHORMADE, DESHPANDE, 2000).

Quitinases catalisam a hidrólise de quitina entre C1 e C4 consecutivos de duas N-acetylglucosaminas. A quitina é um polímero linear de β 1-4 N-acetilglicosamina, e é o principal componente da parede celular de fungos. O metabolismo deste polímero é crucial para o desenvolvimento de fungos, e por isso, os genes envolvidos neste processo, como os genes de sintase de quitina e de quitinase tornam-se um importante alvo no controle de fungos patogênicos (HERRERA, et al., 2001).

Enzimas capazes de que lisar a parede celular de leveduras, como a quitinase, têm diversas aplicações biotecnológicas. São utilizadas na preparação de protoplastos, extração de proteínas, enzimas e pigmentos, preparação de ração animal, obtenção de carboidratos funcionais, pré-tratamento para a ruptura mecânica de células, como ferramenta para a determinação da composição da parede celular de leveduras, no estudo do mecanismo da síntese da parede celular para controle de leveduras patogênicas (FLEURI; SATO, 2008).

O presente trabalho teve como objetivo realizar estudo da otimização da obtenção da enzima quitinase produzida pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*.

Justifica-se este trabalho na necessidade de se obter extratos enzimáticos contendo quitinase com elevadas atividades catalíticas, que posteriormente podem ser utilizadas na aplicação da enzima para a obtenção de produtos biotecnológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

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

O meio base usado para a fermentação de *Moniliophthora perniciosa* foi composto por (g L^{-1}): farelo de trigo (40 g), sulfato de magnésio (0,2 g), cloreto de potássio (0,2 g), monohidrogenofosfato de potássio (1,0 g) e 1000 mL de água destilada. A esse meio foram adicionadas diferentes concentrações de extrato de levedura como indutor, conforme o planejamento experimental. A concentração do indutor foi estudada em cinco níveis (3; 4,5; 6; 7,5 e 9 g/L) e o tempo de fermentação em três níveis (7, 14 e 21 dias). O pH do meio foi ajustado para 6,8. O meio para o crescimento da levedura era composto de extrato de levedura 3g/L, extrato de malte 3g/L, peptona 5g/L, glicose 10g/L e agar 20g/L dissolvidos em água destilada, pH 6,8.

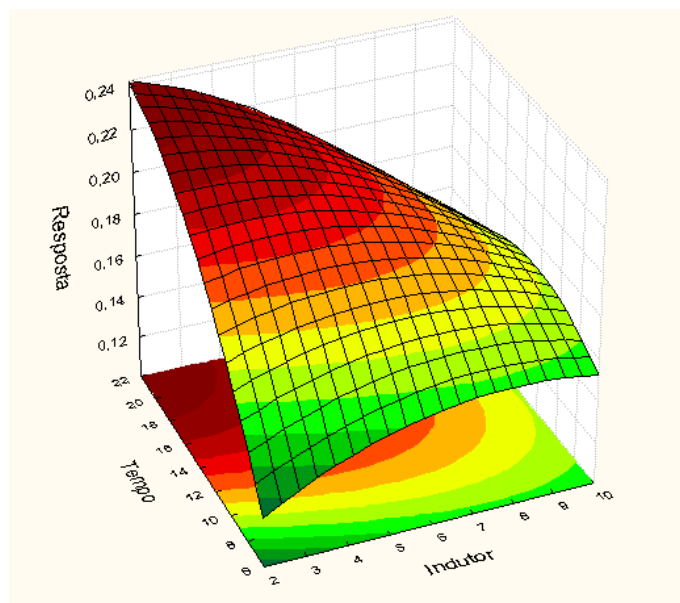
A enzima foi obtida a partir do rompimento dos basidiomas do fungo e de extração com auxílio de tampão extrator na razão 1:3 (grama de fungo/mL de tampão) fosfato pH 7,0, 50mM, e NaCl 0,6M. A mistura obtida foi filtrada, centrifugada e o sobrenadante foi saturado com sulfato de amônio (70%). Centrifugou-se novamente (10.000 RPM), sendo o sobrenadante descartado e o precipitado, contendo a enzima, ressuspenso com o tampão extrator na razão de 1:3 (g/mL).

Para a determinação da atividade lítica da enzima quitinase em cada um dos pontos em estudo, uma alíquota de 500 μL do extrato enzimático foi adicionado a 500 μL de solução de quitina 1% em tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,0, e incubados por 30 minutos a 50°C. Após esse período foram adicionados 1000 μL de DNS e incubado a 95°C por 15 minutos. Após resfriar a temperatura ambiente, foi adicionado 10mL de água destilada, e a leitura da absorbância foi feita num comprimento de onda de 540nm.

A partir dos resultados obtidos, plotou-se um gráfico de superfície de resposta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Buscou-se a otimização da obtenção da enzima quitinase através da variação da quantidade de indutor no meio de cultura e do tempo de fermentação. Passados os 7, 14 e 21 dias de incubação com as diferentes concentrações de indutor, mediu-se a atividade enzimática da quitinase em cada ponto experimental, e a partir dos resultados gerados foi possível plotar o gráfico de superfície resposta apresentado na Figura 1, o qual correlaciona o tempo de fermentação com a concentração de indutor utilizada.



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

Figura 1: Superfície de resposta obtida a partir da otimização da obtenção de quitinase como resposta para tempo de fermentação e concentração de indutor.

CONCLUSÃO

O ponto máximo da obtenção da enzima quitinase não foi possível de ser determinado, conforme observado no gráfico de superfície de resposta obtido. Desta forma, faz-se necessário realizar um novo planejamento experimental, deslocando o experimento para um maior tempo de fermentação.

Entretanto, os resultados demonstram que o extrato de levedura é um eficiente indutor da síntese de quitinase pelo fungo *M. pernicioso*, sendo portanto, útil quando se deseja obter uma maior atividade lítica da enzima.

REFERÊNCIAS

- FLEURI, L. F.; SATO, H. H. β -1,3 glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 32, n. 4, p. 1224-1231, 2008.
- HERRERA, J.R. et al. 2001. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. FEMS Yeast Res, n. 4, p. 247-256.
- PATIL, R.S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M.V. Chitinolytic enzymes: an exploration. Enzyme and Microbial Technology, v.26, p.473-483, 2000.
- PERRAKIS, A., et al. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. Structure, v. 2, p. 1169, 1994.