

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

1. **Edilene Andrade Oliveira**, Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando no curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: edylene\_andrade@hotmail.com
2. Orientadora: **Sandra Aparecida Assis**, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: sandrinhaassis@yahoo.com.br

**PALAVRAS-CHAVE:** Enzimas, fungos, catalisadores.

### INTRODUÇÃO

As enzimas constituem o principal alvo da pesquisa em biotecnologia, não apenas por seu papel crucial nos mecanismos celulares, mas também por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais e de interesse industrial. Apesar do alto custo na utilização de enzimas nos processos industriais, suas vantagens em diversos campos fazem com que uma variada gama de indústrias as utiliza em seus processos como as indústrias de: detergentes, alimentos e rações, papel e celulose, química fina e fármacos, e pela indústria têxtil (PZSCZOLA, 2001). Elas têm um alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram as reações químicas de maneira formidável e funcionam em soluções aquosas sob condições muito suaves de temperatura e pH, sendo que poucos catalisadores não-biológicos apresentam tais propriedades.

Este estudo teve como objetivo obter as enzimas quitinases, laminarinase, e celulasas, a partir de fungos isolados do Semi-árido baiano e realizar a caracterização dessas enzimas, avaliando sua termoestabilidade e fatores que afetam sua atividade enzimática como a temperatura e o pH.

As enzimas quitinase, celulase, e laminarinase, possuem 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). A celulase é utilizada em processos industriais, na clarificação de sucos, na extração de: componentes do chá verde, óleos essenciais, e na reciclagem de papel ofício (indústrias de papel), (JEFFRIES et al, 1994), entre outros. Já a quitinase é utilizada em controle biológico de insetos e de fungos fitopatogênicos (SAUSMIKAT, 2008).

A pesquisa juntamente com a exploração tecnológica dos recursos microbianos, é ainda bastante limitada no Brasil, e escassa na região Semi-árida brasileira, entretanto conhecer a biodiversidade do semi-árido é de suma importância, pois suas características podem apresentar organismos resistentes a condições extremas e, em consequência, enzimas de enorme potencial para aplicação em processos industriais.

### MATERIAL, MÉTODOS OU METODOLOGIA

#### Obtenção de Enzimas

Foram utilizadas nesse estudo a levedura *Pseudozyma* sp (CCMB 306) e a levedura *Rhodothurola mucilaginosa* (33D1).

#### Caracterização das Enzimas

**Termoestabilidade:** As amostras foram encubadas em banho-maria em diferentes temperaturas (50 - 80 °C) e tempos (0 - 50 minutos), com intervalos fixos de 10°C e 10 minutos.

### Determinação da Atividade Enzimática das Enzimas

Para a determinação da atividade da quitinase foi utilizada a quitina 1,0% preparada em tampão fosfato de sódio, pH 7,0, como substrato. No caso da enzima laminarinase usou-se laminarina 0,1% preparada em tampão citrato, pH 6,2, como substrato. No caso da enzima celulase, usou-se carboximetilcelulose 0,5% preparada em tampão fosfato de sódio, pH 6,0, como substrato. O meio reacional usado nas enzimas quitinase e celulase foi composto de 250  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático e 250  $\mu\text{L}$  do substrato. O meio reacional para a laminarinase foi composto de 200  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático e 200  $\mu\text{L}$  do substrato. A solução foi mantida em banho de aquecimento a 50°C por 30 minutos. Após a incubação, os açúcares redutores foram determinados através do método de açúcares redutores (DNS) (Miller, 1959).

Adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de DNS para a quitinase e celulase e na laminarinase 400  $\mu\text{L}$  e levou-se a banho-maria a 95°C por 15 minutos. A mistura foi resfriada acrescentando-se 10 ml de água destilada para a quitinase 5ml para a celulase e 4ml para a laminarinase. A atividade foi lida em espectrofotômetro (UV/VIS modelo Varian) a 540 nm.

Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicatas, sendo considerados os resultados que diferiam em até 10%.

### RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os resultados das atividades das enzimas, obtidas a partir das leveduras *Pseudozyma* sp. CCMB 306 e *Rhodothuroloa mucilaginoso* 33 D1.

Tabela 1: Unidade de atividade enzimática, produzida por micro-organismos leveduriformes Isolados do Semi-árido baiano.

Microorganismo	Enzima	UA ( $\mu\text{mols}/\text{min}$ )
<i>Pseudozyma</i> sp. CCMB n° 306	Carboximetilcelulase	0,12 $\pm$ 0,05
	Quitinase	0,00 $\pm$ 0,00
	Laminarinase	0,16 $\pm$ 0,05
<i>Rhodothuroloa mucilaginoso</i> 33 D1	Carboximetilcelulase	1,35 $\pm$ 0,01
	Quitinase	1,39 $\pm$ 0,48
	Laminarinase	1,93 $\pm$ 0,01

CCMB = Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia; UA = unidade de atividade.

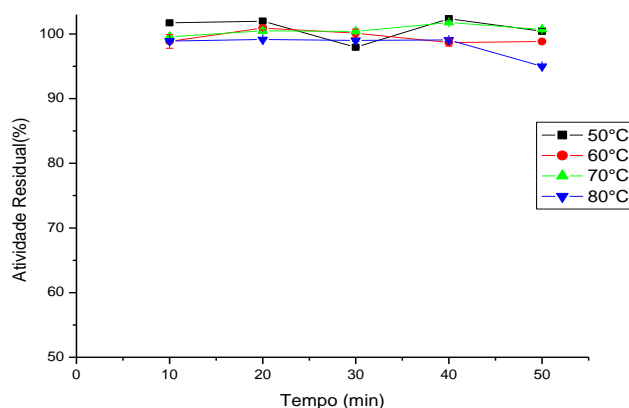
Fonte: O autor

Observa-se, (Tabela 1), que as enzimas carboximetilcelulase, quitinase e laminarinase obtidas a partir do micro-organismo 33D1 apresentaram maior atividade enzimática, em relação às enzimas obtidas a partir de *Pseudozyma* sp. CCMB 306. Em relação à enzima quitinase, não foi observada atividade nas amostras estudadas da CCMB 306.

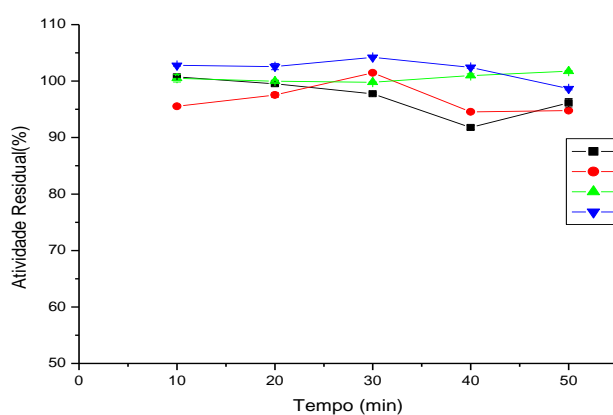
#### Estudos de Termoestabilidade

O efeito da termoestabilidade da enzima celulase (Figura 01), provenientes da CCMB 306, e da *Rhodothuroloa mucilaginoso* 33D1 encontradas também na laminarinase e quitinase, (Figuras 02,03 e 04), foi observada para as temperaturas 50, 60, 70 e 80°C, nos tempos de 10, 20, 30, 40 e 50 minutos.

Pode-se observar na figura 01 que no ensaio de termoestabilidade da celulase, a mesma apresentou alta estabilidade da atividade enzimática em todas as temperaturas apenas com uma diminuição da atividade na temperatura de 50°C no tempo de 20 minutos, acompanhado de um aumento no tempo de 30 minutos. Após o tempo de 40 minutos ocorreu uma diminuição nas temperaturas exceto a de 60°C.

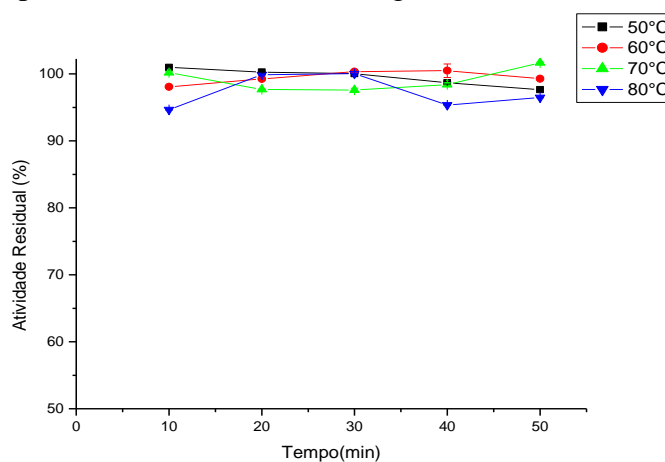


**Figura 01:** Termoestabilidade da celulase, proveniente do *Pseudozyma SP. CCMB 306*, em diferentes temperaturas



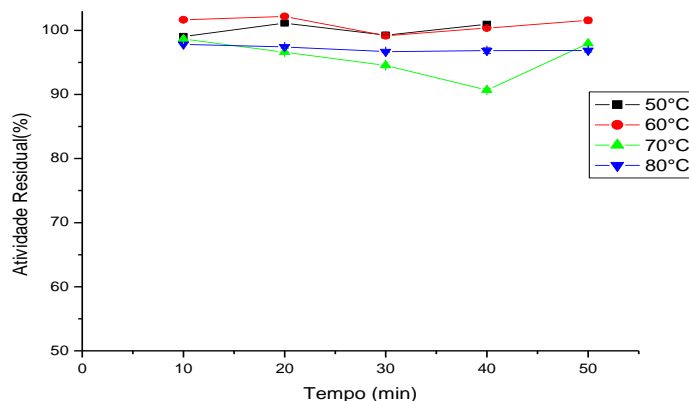
**Figura 02:** Termoestabilidade da celulase, proveniente da *Rhodothurola mucilaginosa (33D1)*, em diferentes temperaturas

Na Figura 02 nos ensaios de termoestabilidade da celulase, proveniente da 33D1, foi possível observar uma significativa diminuição da atividade enzimática nas temperaturas de 50°C e 60°C no tempo de 30 minutos, seguido de um aumento no tempo de 40 minutos. Já nas temperaturas de 70°C e 80°C a atividade enzimática se manteve, com uma razoável diminuição apenas na temperatura de 80°C no tempo de 30 minutos. Desse modo pode-se observar que a estabilidade celulase proveniente da levedura *Rhodothurola mucilaginosa* 33D1 nas diferentes temperaturas foi relativamente significativa.



**Figura 03:** Termoestabilidade da laminarinase, proveniente da *Rhodothurola mucilaginosa 33D1*, em diferentes temperaturas.

Nos ensaios de termoestabilidade da laminarinase,(Figura 03) pode-se observar uma estabilidade da atividade enzimática em todas as temperaturas com um expressivo aumento na temperatura de 80°C no tempo de 20 minutos, e se mantendo estável até 30 minutos, e com uma pequena diminuição entre o tempo de 30 a 40 minutos. Sendo assim observa-se que a laminarinase tem uma acentuada estabilidade comparada com as outras enzimas.



**Figura 04:** Termoestabilidade da Quitinase, proveniente da *Rhodothurola mucilaginosa* 33D1, em diferentes temperaturas.

Nos ensaios de termoestabilidade da quitinase,(Figura 04) pode-se observar que ocorreu uma nítida diminuição da atividade enzimática na temperatura de 70°C entre os tempos de 10 a 40 minutos com um conseqüente aumento no tempo de 40. Já nas outras temperaturas a estabilidade enzimática foi bastante relevante destacando a temperatura de 80°C que se manteve constante em todos os tempos tornando os resultados dessa incubação em ótimos níveis de equilíbrio.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

As enzimas carboximetilcelulase, quitinase e laminarinase obtidas a partir do micro-organismo 33D1 apresentaram maior atividade enzimática, em relação às enzimas obtidas a partir de *Pseudozyma* sp. CCMB 306.

Os resultados obtidos permitiram concluir que as enzimas celulase, laminarinase e quitinase, são bastante termoestáveis, 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 com enzimas termoestáveis, esse processo torna-se facilitado, o que assegura uma produção elevada a baixos custos.

### REFERÊNCIAS

- WALLECHA AND SAROJ, 2003. Purification and characterization of two  $\beta$ -glucosidases from a thermo-tolerant yeast *Pichia etchellsii*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1649, 74-84.
- JEFFRIES, T.; KLUNGNESS, J. H.; SYKES, M.; CROUSEY, K. 1994. Comparison of enzyme-enhanced with conventional deinking of xerographic and laser-printed paper. *Tappi J.*, v. 77, p. 173-177.
- MILLER, G.L. 1959. *Analytical Chemistry*, 31(3):426-428.
- PZSCZOLA, D. E. 2001. From soybeans to spaghetti: the broadening use of enzymes. *Food Technology*, n. 55, p. 54-62.
- SAUSMIKAT. Et al. Atividade quitinolítica de quitinase recombinante isolada de *Chromobacterium violaceum* expressa em *Escherichia coli*. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética • 16 a 19 de setembro de 2008. Disponível em: <<http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs2008/24666.pdf>> Acesso em: 01 ago. 2011.