

OBTENÇÃO DE PROTEASES E POLISSACARÍDEOS DE INTERESSE INDUSTRIAL A PARTIR DE FUNGOS ISOLADOS DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO

Mineia Araujo Santiago¹; Sandra Aparecida de Assis²; Gildomar Lima Valasques Junior³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: miny_santh@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: sandrinhaassis@yahoo.com.br
3. Mestrando em Biotecnologia, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: jrvalasques@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: biotecnologia, polissacarídeo, enzimas.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a busca por microorganismos com potencial biotecnológico tem crescido. Tal fato é devido ao reconhecimento da utilidade de produtos sintetizados e extraídos a partir formas vivas que possuem aplicabilidade em diversos setores atuais. Segundo Plaff & Starmer (1987), a distribuição de microorganismos viáveis é ampla, apontando para o potencial biotecnológico que o semi-árido representa. Todavia, a pesquisa e exploração tecnológica em diversidade microbiana são limitadas no Brasil e inexpressível na região semi-árida brasileira (MELO, 2005).

Dentre os produtos obtidos de espécimes microbianos, as enzimas e polissacarídeos ocupam um papel de destaque. Dentre estas, as proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais (LADEIRA *et al.*, 2010). Também, a variedade das estruturas e propriedades físicas atribuídas aos polissacarídeos microbianos permite sua ampla utilização, podendo ser utilizados como adjuvantes em diversos processos dependendo de sua estrutura química (LOPES, 1991).

Em vista disso, o presente trabalho visa contribuir para o desenvolvimento de conhecimentos que permitam explorar de modo racional e eficiente o potencial apresentado por esses microorganismos. Além disso, objetiva viabilizar a descoberta de novos produtos e aperfeiçoar a produção dos já conhecidos, bem como entender o comportamento dos microorganismos em estudo e determinar as melhores condições de crescimento e produção, permitindo contribuir para o aprimoramento das informações já descritas na literatura.

METODOLOGIA

Obtenção do Microorganismo

As leveduras utilizadas foram a *Rhodothurola mucilaginosa* (33d1 CCMB) e o fungo endofítico (327 CCMB), provenientes do Laboratório de Enzimologia (LAEN), na Universidade Estadual de Feira de Santana.

Condições de Fermentação

Para a fermentação foi adicionado 10 mL do inóculo (composto por solução salina 0,45% com alças de microorganismo, apresentando absorvância aproximada de 1, a 600 nm) à 90 mL do meio de cultura estéril em erlenmeyer de 250 mL para cada amostra. Incubou-se em *shaker* orbital a 80 rpm e à temperatura de 28° C. Os meios de cultura utilizados foram: CPM (40,0 g de glicose; 8,0 g de KH₂PO₄; 0,5 g de MgSO₄. 7H₂O; 3,0 g de extrato de levedura; 1 L

de água destilada), MMS (10,0 g de glicose; 2,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,0 g KH_2PO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g de extrato de levedura; 1 L de água destilada) e YM (3,0 g de extrato de levedura; 3,0 g de extrato de malte; 5,0 g de peptona de carne; 10,0 g de glicose; 1L de água destilada).

Produção e Extração de Polissacarídeos

Após a centrifugação do fermentado, parte do sobrenadante destinada à obtenção de exopolissacarídeos. Para isto, adicionou-se etanol na proporção 1:3 (sobrenadante/etanol) ao sobrenadante, mantendo-o em refrigerador por 24 horas. Após esse período, essa mistura foi centrifugada, com descarte do líquido resultante e condução do precipitado à secagem em estufa a 55°C por 24 horas.

Obtenção de Enzimas

Após a centrifugação do inóculo fermentado, as células foram lavadas e congeladas e parte do sobrenadante destinada à pesquisa da atividade enzimática da protease presente.

Determinação da Atividade da Enzima Protease

A determinação enzimática seguiu o método utilizado por França-Santos *et al.* (2009). O meio reacional consistiu de 100µL do extrato enzimático mais 4,9 ml de reagente de Bradford (BRADFORD, 1976) com posterior leitura em espectrofotômetro (595 nm).

ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Otimização da Produção de Polissacarídeo

Variação do Meio de Cultura

Os meios escolhidos mediante levantamento bibliográfico foram o CPM, MMS e YM e YM modificado. Através da massa do polissacarídeo obtido, observou-se que ambos os microorganismos produziam bem no meio YM modificado. O tempo de fermentação foi de 5 dias. Essa diferença observada no crescimento dos microorganismos em relação aos tipos de meios de cultura pode ser explicada pelo acréscimo de sais ao meio YM usual, favorecendo o desenvolvimento mais efetivo dos tipos de levedura em estudo. Através da Figura 1 é possível notar a visível diferença na síntese do bioproduto nos diferentes meios, sendo que o MMS e YM modificado apresentaram uma produtividade próxima, podendo ser explicada pela proximidade constitucional desses meios.

Tabela 1. Relação entre variação de meio e produção de exopolissacarídeo das leveduras 33d1 e 327

Microorganismo	Meio de Cultura	Massa de polissacarídeo (g/100mL de sobrenadante)	Desvio Padrão
33d1 (<i>Rhodothurola mucilaginosa</i>)	CPM	0,2937	0,0140
	MMS	0,4463	0,0097
	YM	0,3665	0,0223
	YM modificado	0,4920	0,0083
327 (Fungo endofítico)	CPM	0,2029	0,0068
	MMS	0,3881	0,0118
	YM	0,3012	0,0141
	YM modificado	0,4158	0,0144

Influência do tempo de fermentação

Avaliou-se a influência do tempo, na obtenção da massa de polissacarídeos, nos tempos de 2, 4 e 5 dias. De acordo com a Figura 2 é possível inferir que os microorganismos apresentaram um perfil de produção semelhante. Em ambos, foi constatado que o aumento do tempo de fermentação leva a uma produção também maior do polissacarídeo. Ou seja, a síntese de polissacarídeo acompanha o perfil de crescimento das células.

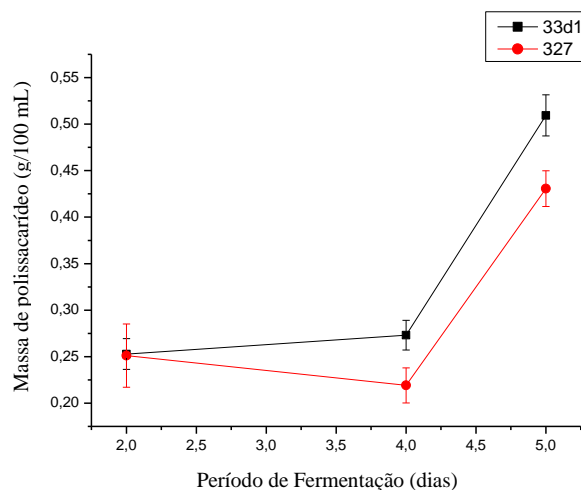


Figura 1. Gráfico relacional entre tempo de fermentação e produção de exopolissacarídeo das leveduras 33d1 e 327

Determinação da Atividade da Enzima Protease

Os sobrenadantes utilizados foram obtidos da fermentação usando-se 10g de glicose em 1000 mL de meio; os dias de incubação 2, 3, 4, 5 e 6 foram testados para determinar sua influência na produção de enzimas. Na Figura 3 é possível observar a máxima atividade da protease é obtida quando a fermentação é de 4 dias e a quantidade de glicose é de 10 g em 1000 mL de meio, sendo que a protease produzida pela levedura CCMB 327 apresenta esse pico com 5 dias de fermentação. Com o aumento do tempo de incubação, a atividade da enzima novamente começa a cair. Esse fato pode ser explicado pela diminuição da viabilidade da enzima quando o crescimento da colônia entra na fase de declínio.

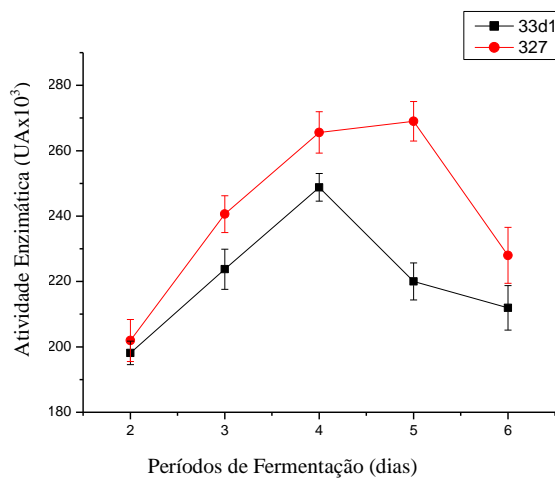


Figura 2. Perfil da atividade enzimática da protease em relação ao tempo de fermentação dos microorganismos 327 e 33d1.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados indicam que as leveduras analisadas são promissoras quanto à síntese de polissacarídeos e produção de enzimas viáveis quando cultivadas no meio YM modificado, demonstrando este ser um meio adequado para as condições descritas. A máxima produção de polissacarídeos alcançadas por ambas as leveduras neste meio foi nas condições de 5 dias de incubação e 5 g de glicose em 1000 mL de meio. E a atividade enzimática da protease foi maior nas condições de cultura de 5 dias de fermentação para a 327 e 4 dias para a 33d1 e 10 g de glicose em 1000 mL de meio. Logo, dependendo do objetivo do estudo (determinação de atividade enzimática ou produção de polissacarídeo) os microorganismos estudados devem ser conduzidos em condições específicas, pois se comportam diferentemente dependendo do ambiente de cultura.

REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248:254, 1976.
- FRANÇA-SANTOS, A.; ALVES, R. S.; LEITE, N. S.; FERNANDES, R. P. M. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). **Scientia Plena**, São Cristóvão, v. 5, n. 11, 2009.
- LADEIRA, S. A. et al . Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, 2010.
- LOPES, L.; ANDRADE, C. T.; MANO, E. B. O valor das gomas para as indústrias. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 12, n. 71, p. 65-67, mar. 1991.
- MELO, D. L. F. M. **Potencial biotecnológico do umbu**: perspectivas para o semi-árido. 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Núcleo de Pós-graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2005.
- PLAFF, H. J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soils. **Yeasts**. v. 1, p. 123-180, 1987.