

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

Mineia Araujo Santiago¹; Sandra Aparecida de Assis²

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: minne.santiago@bol.com.br
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: sandrinhaassis@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: biotecnologia, enzimas, polissacarídeo.

INTRODUÇÃO

A partir de micro-organismos é possível obter produtos que possuem uma variedade de aplicações biotecnológicas. Segundo Plaff&Starmer (1987), a distribuição de micro-organismos viáveis é bastante ampla, apontando para o potencial biotecnológico que o semi-árido representa. Entretanto, a pesquisa e exploração tecnológica em diversidade microbiana são significativamente limitadas no Brasil e inexpressível na região semi-árida brasileira. Por isso, nos últimos anos a região semi-árida do Nordeste brasileiro ganhou importância e passou a ser foco de diversos estudos na busca de alternativas que ampliem as possibilidades de utilização de seus recursos (MELO, 2005).

Dentre os produtos obtidos de espécimes microbianos, as enzimas e polissacarídeos ocupam um papel de destaque. Enquanto as enzimas, segundo Jayaniet *al* (2005) e Whitaker (1984), apresentam aplicabilidade na indústria de sucos, alimentos e papel, podendo ser utilizadas no seu processamento. Os polissacarídeos, devido à das suas estruturas e propriedades físicas, permitem sua ampla utilização nos mais diversos setores industriais (alimentício, farmacêutico, petrolífero, cosmético, têxtil e agrícola). Podendo ser utilizados como emulsificantes, estabilizantes, ligantes, agentes gelificantes, coagulantes, lubrificantes, formadores de filme, floculantes, adesivos ou redutores de fricção, dependendo de sua estrutura química (LOPES; ANDRADE; MANO, 1991). Como principal vantagem para a utilização desses produtos microbianos, apontada por Steele&Stowers (1983), é que estes são mais facilmente aceitos e aprovados para a comercialização em detrimento dos produtos obtidos de micro-organismos geneticamente modificados.

Os estudos biotecnológicos têm potencial para inferir positivamente na criação e otimização de processos industriais alternativos, bem como na resolução de problemas terapêuticos (MELO, 2005). Dentre as várias ferramentas utilizadas pela biotecnologia, os micro-organismos têm destaque. 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 micro-organismos. Além disso, objetiva viabilizar a descoberta de novos produtos e aperfeiçoar a produção dos já conhecidos.

METODOLOGIA

Obtenção do Micro-organismo

Os micro-organismos utilizados foram as leveduras *Candidaboidinii* C. CCMB 297, *Pseudozima sp.* CCMB 300, *Cryptococcusliquefaciens* CCMB 302, *Trichosporonoides sp.* CCMB 303, *Pseudozyma sp.* CCMB 306, *Rhodotorulaoryzicola* CCMB D2-T6-1, *Kluyveromycesmarxianus* CCMB 322, fungo endofítico CCMB 328 e CCMB Red 1T-85 provenientes do Laboratório de Enzimologia (LAEN), na Universidade Estadual de Feira de

Santana. Os micro-organismos foram conservados em meio YM sólido (Composição: extrato de levedura 3,0 g/L; extrato de malte 3,0 g/L; peptona de carne 5,0 g/L; glucose 10,0 g/L e ágar 15,0 g/L) sob refrigeração e cultivados em estufa (a 28° C) até início da fermentação.

Condições de Fermentação

A fermentação foi realizada usando 90 mL de meio de cultura estéril e 10 mL de inóculo (composto por solução salina 0,45% com alças de micro-organismo, apresentando absorvância aproximada de 1, a 600 nm). Utilizou-se um shaker orbital a 75 rpm e à temperatura de 28° C por 5 dias. O meio de cultura utilizado para a fermentação foi o YM modificado (Composição: extrato de levedura 3,2 g/L; extrato de malte 3,0 g/L; peptona de carne 5,0 g/L; glicose 10,0 g/L; K₂HPO₄ 2,0 g/L; MgSO₄.7H₂O 2,7 g/L e KH₂PO₄ 13,62 g/L).

Produção e Extração de Polissacarídeos

Após a fermentação, centrifugou-se o fermentado, sendo que posteriormente as células foram congeladas e parte do sobrenadante foi separado a fim de obter os exopolissacarídeos presentes. Para isso, adicionou-se etanol na proporção 1:3 (sobrenadante/etanol) ao sobrenadante e essa solução foi armazenada em refrigerador por um período de 24 horas. Em seguida, o produto resultante foi centrifugado, com a finalidade de separar o precipitado (polissacarídeo extracelular). O precipitado foi levado à secagem em estufa a 55°C por 24 horas, pesado e acondicionado para posterior purificação e quantificação.

Obtenção de Enzimas

Após a centrifugação do inóculo fermentado, as células foram lavadas e congeladas e parte do sobrenadante foi separado a fim de pesquisar a atividade enzimática da protease presente.

Determinação da Atividade Enzimática

A determinação enzimática seguiu o método utilizado por França-Santos *et al* (2009). Após o tempo de incubação, 100µL do caldo resultante da reação foram reagidos com 4,9 ml de reagente de Bradford (BRADFORD, 1976) com posterior leitura em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 595 nm.

ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Avaliação da produção de Exopolissacarídeos

Avaliou-se a produção de exopolissacarídeos mediante comparação das leveduras utilizadas inoculadas sob as mesmas condições (de acordo com o item “Condições de Fermentação”), demonstrada na Figura 1.

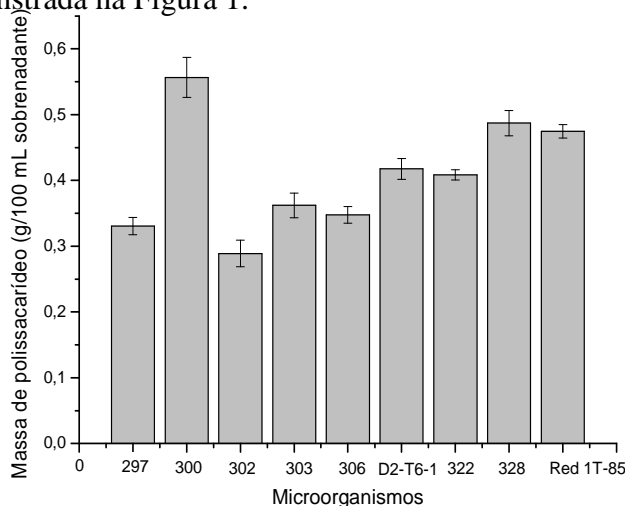


Figura 1: Relação da produção de exopolissacarídeo nos micro-organismos utilizados

Os micro-organismos *Pseudozimas* sp. CCMB 300, Fungo endofítico CCMB 328, e CCMB Red1T-85 apresentaram um desempenho notoriamente superior aos demais, destacando-se a *Pseudozima* sp. CCMB 300. Sendo que a *Cryptococcusliquefaciens* CCMB 302 apresentou o valor mais baixo observado.

Os resultados foram contrários aos encontrados por Fontes *et al* (2008). Nessa revisão a produção de polissacarídeo foi melhor observada nos micro-organismo da espécie de *Candida* em meio de cultivo e condições semelhantes aos utilizados, que no presente estudo apresentou-se como uma das mais baixas. Entretanto, nos ensaios de Rodrigues (2009), as espécies de *Pseudozima* são apontadas como produtores viáveis de polissacarídeos de aplicação industrial, apresentando o rendimento de 0,650 g/100 mL de exopolissacarídeo.

Determinação da Atividade da Enzima Protease

A atividade da protease (Figura 2) foi determinada pelo método de digestão da caseína no qual o método Bradford é usado para quantificar as proteínas. Este método se fundamenta na ligação da proteína ao corante Coomassie brilhante blue G-250, ligação essa que causa a mudança na absorbância do corante. Este procedimento avalia a aplicação das proteases produzidas pelas enzimas analisadas, considerando-se as condições de fermentação.

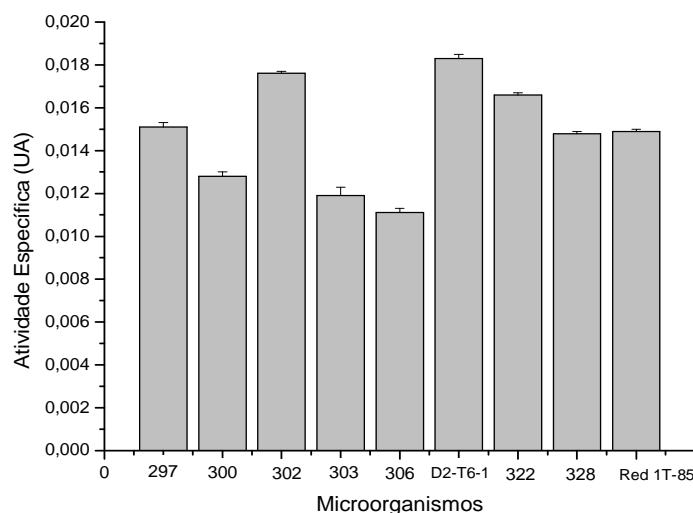


Figura 2: Relação da atividade enzimática da protease nos micro-organismos utilizados

Conforme Figura 2, A atividade da protease presente no extrato enzimático foi notavelmente maior nos micro-organismos *Cryptococcusliquefaciens*(CCMB 302) e *Rhodotorula oryzoicola*(CCMB D2-T6-1). Esse destaque pode ser devido ao comportamento favorável desses micro-organismos nas condições de fermentação empregadas, bem como pela variedade de proteases existentes nos extratos utilizados e que diferem entre si na sua ação sobre o substrato, além de estar suscetíveis a oxidar ou reduzir podendo contribuir, assim, para as diferenças observadas. Entretanto, esse desempenho aponta para um perfil insatisfatório de ação da enzima estudada sobre o substrato utilizado e nas condições fixadas.

De acordo com a revisão de Ferreira (2007), os micro-organismo que mais apresentam grande habilidade caseinolítica pertencem às espécies *Cryptococcus* sp e *Pseudozimas* sp. Apesar de *Cryptococcusliquefaciens*(CCMB 302) apresentar uma atividade maior, destoa dos níveis aceitáveis de atividade para fins industriais, de acordo com os estudos de Giongo

(2006) que encontrou uma média de $95,0 \pm 0,03$ U/mL para o substrato usado. Logo, as enzimas em estudo não apresentam um potencial proteolítico interessante à aplicação industrial. Assim, a baixa produtividade caseínolítica, inviabiliza a utilização desses micro-organismos para este fim. Entretanto, visto serem relatados na literatura como produtoras de outras enzimas, esses espécimes podem ser utilizados para testes e ensaios além do proposto pelo presente trabalho.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados indicam que as leveduras *Candidaboidinii* C. CCMB 297, *Pseudozyma* sp. CCMB 300, *Cryptococcusliquefaciens* CCMB 302, *Trichosporonoides* sp. CCMB 303, *Pseudozyma* sp. CCMB 306, *Rhodotorula oryzaicola* CCMB D2-T6-1, *Kluyveromycesmarxianus* CCMB 322, fungo endofítico CCMB 328 e CCMB Red 1T-85 são promissoras quanto à síntese de polissacarídeos, entretanto a produção de enzimas viáveis quando submetidas às condições propostas não foi satisfatória, justificando o abandono do seu uso nas condições citadas.

Como os micro-organismos utilizados apresentam perfis diferenciados (quanto à produção de exopolissacarídeo e atividade proteolítica), convém buscar condições específicas de cultivo que atendam às necessidades do estudo.

REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Bioch.**, 72:248:254, 1976.
- FERREIRA, E. G. **Leveduras associadas a diferentes substratos naturais com potencial de produção de enzimas e substâncias bioativas**. 2007. 58f. Monografia (Especialização em Microbiologia) – Programa de pós-graduação em microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, 2008.
- FRANÇA-SANTOS, A.; ALVES, R. S.; LEITE, N. S.; FERNANDES, R. P. M. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananascomosus* (abacaxi). **Sci. Plena**, São Cristóvão, v. 5, n. 11, 2009.
- GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.** 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- JAYANI et al. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Proc. Bioch.**, 2005.
- LOPES, L.; ANDRADE, C. T.; MANO, E. B. O valor das gomas para as indústrias. **Ciên. 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 em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – 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.

RODRIGUES, R. S. B. **Produção e caracterização de um biocatalisador heterogêneo para ser utilizado em aplicações industriais.** 2009. 177 f. Tese. (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

STEELE, D. B.; STOWERS, M. K. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Anual Rev. of Microb.**, v. 45, p. 89-106, 1991.

WHITAKER, J. R. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enz. Microb. Tech.**, v. 6, p. 341-349, 1984.