

INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS, DE INTERESE EM ALIMENTOS POR FUNGOS ISOLADO DO SEMIÁRIDO BAIANO.

LEONAIARA MARIANO SANTOS; ¹ **ANDREA LIMOEIRO CARVALHO**²;
MARÍLIA LORDÊLO CARDOSO SILVA³.

1. Bolsista PROBIC, Graduando em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: nara_mariano21@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: limoeiro@uefs
3. Integrante do Projeto, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lilaengal@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: Leveduras, pectinases, actinobactérias.

INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas nos diversos segmentos da indústria química, farmacêutica e de alimentos tem se tornado cada vez mais frequente. As enzimas apresentam algumas propriedades que tornam o seu uso altamente desejável como catalisadores. Elas são ativas e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido sem ocorrência de reações paralelas indesejáveis que são muito comuns em sínteses químicas (PIZARRO & PARK, 2003 *apud* COLEN, 2006).

As enzimas pectinolíticas, ou pectinases são as responsáveis pelo rompimento das ligações existentes das substâncias pécticas, sendo produzidas somente por vegetais e micro-organismos. Elas estão envolvidas nos processos fisiológicos dos vegetais e são empregados em nível industrial destacando-se por serem as enzimas mais utilizadas pelas indústrias de processamento de frutas (HENNIES, 1996 *apud* SANTOS, 2007).

Esse projeto tem por objetivo avaliar a produção de pectinase por micro-organismos pertencentes à Coleção de Cultura de Microrganismos do Estado da Bahia (CCMB) com características interessantes para aplicação industrial.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Crescimento de micro-organismos

Dos micro-organismos pertencentes à Coleção de Culturas de Microrganismos do estado da Bahia (CCMB), 20 leveduras e 10 actinobactérias foram repicadas em meio líquido YM e incubadas a 28° C, sob agitação em shaker orbital por 48h, e depois transferidas para tubos de ensaio contendo meio ágar nutriente incluído. Nesse meio as linhagens foram incubadas em BOD a 28° C por 48h e, então repicadas em meio de indução da produção da enzima.

O meio de crescimento utilizado foi o YM, composto por extrato de leveduras (0,3%), extrato de malte (0,3%), peptona (0,5%), glicose (1,0%), ágar (2,0%), e água destilada como solvente. O meio, depois de dissolvido, foi transferido para frascos de Erlenmeyer e autoclavado a 121°C por 15 minutos, sendo posteriormente vertido em placas de Petri estéreis. Nesse meio as linhagens foram repicadas fazendo-se estrias simples e em seguida foram incubadas em BOD a 28°C por 24h. As placas destinadas a manutenção da cultura foram mantidas sob refrigeração a aproximadamente 10°C.

2- Metodologia de Cup Plate (adaptada de DINGLE *et al.*, 1953 por SOUZA *et al.*, 2003).

No primeiro momento foi feita a indução da secreção das enzimas de interesse pelo micro-organismo em teste e posteriormente a detecção ou a caracterização da produção da enzima em meio sólido contendo um indicador ou revelador. Inicialmente foi utilizado um meio líquido mínimo, contendo 0,5% de pectina cítrica, como indutor da secreção de pectinases. Volume de 5 mL desse meio foram distribuídos em tubos de ensaio e autoclavados a 121°C por 15 minutos. Esses tubos foram então incubados com uma suspensão de células de leveduras em solução salina estéril em concentração correspondente a absorbância próxima de 1,0 a 660 nm. Os tubos foram, então incubados em shaker orbital (150 rpm) por 48 h a 28°C.

A fim de se obter o extrato bruto enzimático os meios de cultivo foram transferidos para tubos de micro centrífuga e mantidos em banho de gelo até serem centrifugados a 3500 rpm por 20 minutos para sedimentação da massa celular e separação do extrato enzimático bruto. Alíquotas de 150µL do extrato bruto foram transferidas para perfurações de 0,6 mm de diâmetro em placas de Petri contendo o meio de caracterização composto por ágar a 1,5% e pectina cítrica a 1,0%, em pH= 5,0. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48h e em seguida reveladas com ácido clorídrico 5N para a evidenciação dos halos de hidrólise.

RESULTADOS

Foram testadas 20 leveduras, porém nenhuma apresentou resultados positivos para a presença de halo por isso foi tomada a decisão de mudar o micro-organismo alvo do trabalho, utilizando actinobactérias pertencentes à mesma coleção.

Dentro das 10 actinobactérias testadas (ainda sem identificação), 4 (quatro) com código PA-10, PA-31, CI-06, CI-21, apresentaram halo de descoloração (Tabela 1) no meio de caracterização contendo pectina cítrica. As actinobactérias apresentaram capacidade de assimilar e crescer em volta da fonte, à pectina, de acordo o metabolismo característico de sua espécie, mostrando que esse grupo de micro-organismos apresenta um grande potencial biológico para os objetivos deste estudo. A figura 1 mostra a formação do halo de descoloração para actinobactéria.

A habilidade dos micro-organismos de utilizarem compostos orgânicos como única fonte de carbono para o crescimento aeróbico pode ser utilizada como critério de identificação, sendo muito útil para diferenciar espécies de leveduras (BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000. KUTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011), bactérias e actinobactérias (BENEDICT *et al.*, 1995).

Tabela 1: Resultado da caracterização de actinobactérias para a produção de pectinases

Actinobactérias	Tamanho do halo (cm)
PA 06	1,02 ± 0,02 ^a
PA 31	1,04 ± 0,04 ^a
CI 21	1,02 ± 0,02 ^a
PA 10	1,01 ± 0,01 ^a



Figura 1: Halo de descoloração para actinobactéria PA 06 em meio de caracterização contendo pectina cítrica.

Após serem medidos com régua comum, o tamanho dos halos foram avaliados com o testes de medidas de Tukey, com 10% de significância. De acordo com a análise estatística não houve variação significativa para o seu tamanho já que deram valores muito próximos. A Figura 1 ilustra os halos observados nas placas.

Buzzini e Martini (2002) investigaram a atividade pectinolítica extracelular de microrganismos leveduriformes, e identificaram que isolados de *Aureobasidium pullulans* e *Pseudozyma antarctica* demonstraram capacidade de hidrolisar a pectina, sendo estes isolados do solo, água, inseto e vegetais coletados em florestas do Brasil.

Strauss *et al.* (2001) demonstraram que alguns isolados de *Kloeckera apiculata* poderiam ser aplicadas na produção de vinho devido a sua capacidade pectinolítica devido a formação de halo de degradação bem evidente. As enzimas pectinolíticas tem sua secreção estimulada em meio rico contendo pectina e outros carboidratos.

Assim as actinobactérias analisadas neste projeto ainda sem identificação pode apresentar algumas destas características já que este grupo de micro-organismo apresenta versatilidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Das 20 leveduras analisadas da coleção da CCMB, nenhuma apresentou resultado positivo para a presença de halo, este fato ocorreu devido às dificuldades de ativação das mesmas. Das 10 actinobactérias analisadas 4 (quatro) deram resultado positivo comprovando que este grupo de micro-organismos apresenta um bom desempenho para o que se espera com este estudo. Com este resultado espera-se selecionar a linhagem de maior potencial secretor e indicar estudos futuros para aperfeiçoar a secreção das actinobactérias.

REFERÊNCIAS

BARNETT, J.A.; PAYNER, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and Identification**. 3º ed. Cambridge: Cambindge University, 200.1134p.

BENEDICT, R. G.. Further studies in evaluation of carbohydrate utilizacion tests as aids in the differentiation of species of streptomyces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 3n.1, p. 1-6. Jan.1955.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal Applied Microbiological**. v.93, p.1020–1025, 2002.

COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P. Efeitos antagônico de actinobactérias isolados de ervas daninhas e gramíneas na formação de galhas e na reprodução de *Meloídogyne javanica* em tomateiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 10, n. 2, p. 144-153, 2010.

COLEN, Gecernir. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lípases**. 2006. 206p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2006.

DINGLE J, REID W.W.; SOLOMOS G.L. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides: II. Application of the 'Cup-Plate' assay to the estimation of enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 4, p. 149-155, 1953.

SANTOS, Sharline Floretino de Melo. **Estudo de produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como Substrato**. 2007. 148p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande Do Norte. Natal. 2007.

SOUZA, J.V.B.; SILVA, E.S.; MAIA, M.L.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Screening of fugal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *peacilomyces clavissporus* 2A. UMIDA. 1 **Process Biochemistry**, v. 39, p. 445-458, 2003.

STRAUSS, M.L.A.; JOLLY, N.P.; LAMBRECHTS, M.G.; RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal Applied Microbiological**. v.91, p.182-190, 2001.