

DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE TERMOESTABILIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASES DE INTERESSE INDUSTRIAL OBTIDAS A PARTIR DE FUNGOS ISOLADOS DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO

Mineia Araujo Santiago¹; Sandra Aparecida de Assis²

1. Bolsista PROBIC/Uefs, Graduanda em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mineiasantiago@ymail.com
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: sandrinhaassis@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: biotecnologia, enzimas, termoestabilidade.

INTRODUÇÃO

A partir de micro-organismos é possível obter produtos que possuem uma variedade de aplicações biotecnológicas. Segundo Plaff e 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.

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 microrganismos 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.

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais e têm aplicação em diferentes setores. São enzimas que catalisam a clivagem das ligações peptídicas de proteínas e que apresentam grande importância do ponto de vista industrial, sendo utilizadas em diversas atividades como no processamento de alimentos, bebidas, formulação de detergentes, processamento de couro e pele, amaciamento de carnes, formulação de medicamentos, indústria têxtil, entre outros (LADEIRA et al, 2010). Olsen (1995) e Timmis e Demain (1998), ainda salientam que o interesse no uso de enzimas para o processamento de alimentos se deve à especificidade de ação, atuação rápida e eficiente em baixas concentrações, a atividade em condições brandas de pH, temperatura e pressão, fácil controle da reação e pequena toxicidade. Além disso, as vantagens de se utilizar enzimas obtidas de células microbianas consistem na facilidade de obter elevadas concentrações de enzimas através de manipulação genética e ajuste das condições de cultivo, fácil e rápida triagem de micro-organismos superprodutores, ciclos de fermentação curtos, uso de meios de fermentação de baixo custo e diversidade de enzimas que catalisam a mesma reação, possibilitando flexibilidade nas condições de uso.

METODOLOGIA

Obtenção do Micro-organismo

Os micro-organismos utilizados nos experimentos foram as leveduras *Pseudozyma* sp. CCMB 299, *Pseudozyma* sp. CCMB 300, *Cryptococcus liquefaciens* CCMB 302, *Trichosporonoides* sp. CCMB 303, *Aureobasidium pullulans* CCMB 324 e *Aureobasidium pullulans* CCMB 325, 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 temperatura de 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 absorbância 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).

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 do Perfil de Termoestabilidade Enzimática

Utilizou-se o método de digestão da caseína (FRANÇA-SANTOS et al, 2009), no qual o ambiente reacional foi composto de 100 µL do extrato enzimático e 4,9 mL do substrato. A solução foi submetida a diferentes temperaturas (50, 60, 70, 80 e 90oC) por diferentes tempos de duração (0, 10, 20 e 30 minutos). Após o término da incubação, os tubos permaneceram em banho de gelo por 30 minutos e, em seguida, 100 µL de cada ambiente reacional foi retirado, em triplicata, e adicionado 4,9 mL de solução reagente de Bradford (BRADFORD, 1976) com posterior leitura em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 595 nm.

ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Com base nos resultados favoráveis obtidos nos testes de determinação da atividade enzimática para os micro-organismos *Aureobasidium pullulans* CCMB 324 e *Aureobasidium pullulans* CCMB 325, foi proposta a realização da determinação do perfil de termoestabilidade para o extrato enzimático obtido dessas leveduras.

Conservando o mesmo método de medição da atividade enzimática inicial, a termoestabilidade da protease presente nos extratos submetidos a diferentes condições foi determinada pelo método de digestão da caseína, utilizando também o método Bradford para a quantificação das proteínas. A atividade da protease 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. Baseado nos dados obtidos do cálculo da atividade específica para ambos os mico-organismo é possível traçar um gráfico comparativo, apresentado a seguir (Figuras 2 e 3).

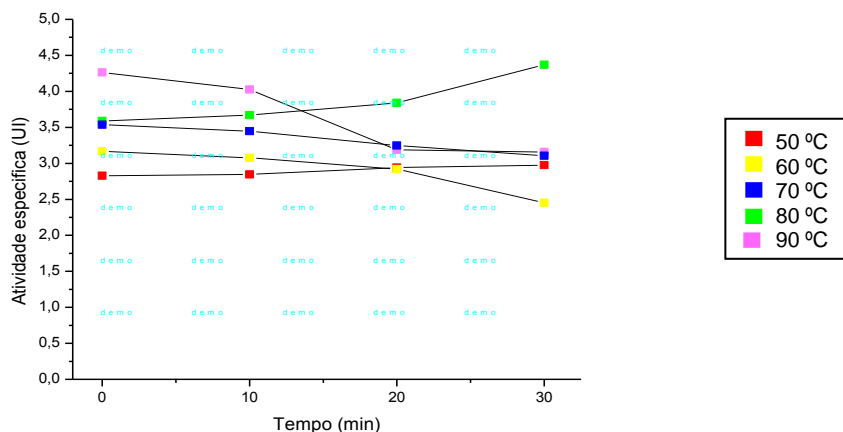


Figura 2: Efeito da incubação da protease de extrato enzimático de *Aureobasidium pullulans* CCMB 324 em diferentes temperaturas

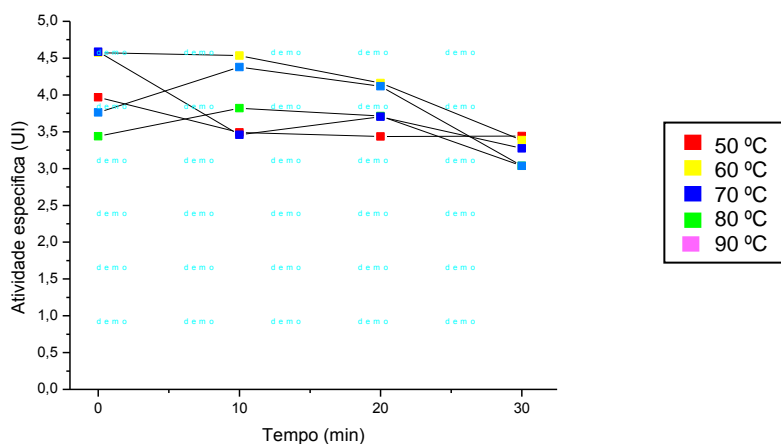


Figura 3. Efeito da incubação da protease de extrato enzimático de *Aureobasidium pullulans* CCMB 325 em diferentes temperaturas

O perfil apresentado pelas cepas de *Aureobasidium pullulans* estudadas correspondem ao descrito na literatura. Enquanto o micro-organismo CCMB 324 apresentou estabilidade até a temperatura de 50°C, o CCMB 325 não apresentou atividade em nenhuma das temperaturas utilizadas no ensaio.

De acordo com Gaur et al (2010), a *Aureobasidium pullulans* exibe uma variação grande entre as espécies identificadas, Zalar et al (2008) cita também que esse polimorfismo é comum e característico da espécie. A diferença observada no perfil de termoestabilidade das exopeptidases estudadas obtidas de diferentes cepas de *A. pullulans* pode ser explicada pelo amplo polimorfismo apresentado entre as espécies de *A. pullulans*. Essa diferença, entretanto, não impossibilita sua utilização no âmbito industrial. Gaur et al (2010) e Deshpande et al (1992) ainda citam a importância da aplicação das enzimas extraídas de cepas de *A. pullulans* uma vez que a literatura já identificou sua expressividade na produção de exopeptidases e por ser de fácil cultivo.

Com relação à atividade enzimática, de acordo com Fedatto (2004), a temperatura ideal das proteases está entre 20 e 30°C, sendo inativada à 40°C o que indica sua sensibilidade a altas temperaturas. Entretanto, quando em extratos aquosos provenientes de micro-organismos, as exopeptidases podem ter sua atividade estendida até 50°C, decrescendo quando em 60 a 65°C e sofrendo inativação quando em 70°C. Gaur et al (2010) afirma que as proteases extraídas de cepas de *Aureobasidium pullulans* apresentam um perfil de diminuição expressiva da atividade quando submetidas a temperaturas de 65°C. O perfil apresentado pelas cepas de *Aureobasidium pullulans* estudadas correspondem ao descrito na literatura. Enquanto o micro-organismo CCMB 324 apresentou estabilidade até a temperatura de 50°C, o CCMB 325 não apresentou atividade em nenhuma das temperaturas utilizadas no ensaio.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados indicam que as exopeptidases obtidas de *A. pullulans* CCMB 324 apresenta um perfil de estabilidade quando o tempo a temperatura é de 50°C, evidenciando constância da atividade nos diferentes tempos de incubação. Sua utilização é possível em processos industriais que considerem essas temperaturas. A utilização de exopeptidases extraídas de *A. pullulans* CCMB 325 não é justificada para processos com

temperaturas iguais ou superiores a 50°C, uma vez que não apresentou atividade catalítica sobre o substrato. Entretanto, visto que existem processos industriais que utilizam variados tipos de temperatura, a utilização de exopeptidases provenientes das cepas estudadas pode ser justificada para processos que utilizem temperaturas inferiores às apresentadas.

Os micro-organismos utilizados no presente ensaio apresentam perfis diferenciados quanto à estabilidade proteolítica, logo convém buscar condições específicas de incubação e cultivo que permitam a utilização dessas leveduras em outros processos.

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.
- DESHPANDE, M. S.; RALE, V. B.; LYNCH, J. M. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. **Enzyme Microb. Technol.** 14:514-527, 1992.
- FEDATTO, L. M. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira.** 2004. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- 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.
- GAUR, R.; SINGH, R.; GUPTA, M.; GAUR, M. K. *Aureobasidium pullulans* an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, pp. 7989-7997, nov. 2010.
- 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.
- 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.
- OLSEN, H. S. Enzymes in Food Processing. In: REHM, H. J.; REED, G. **Biotechnology**. 2. ed. Weinheim: VHC, p. 663-736, 1995.
- PLAFF, H. J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soils. **Yeasts**. v. 1, p. 123-180, 1987.
- TIMMIS, K. N.; DEMAIN, A. L. Ecology and industrial microbiology: strange bedfellows. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 267-270, 1998.
- ZALAR P.; GOSTINCAR, C.; DE HOOG, G. S.; URSIC, V.; SUDHADHAM, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. **Stud. Mycol.** 61: 21-38, 2008.