

SELEÇÃO DE FUNGOS DO SEMI-ÁRIDO BAIANO SECRETORES DE HIDROLASES DE INTERESSE EM ALIMENTOS

*Amanda Reges de Sena**

*Maria Gabriela Bello Koblitz***

*Aristóteles Góes Neto****

*Ana Paula Trovatti Uetanabaro*****

RESUMO — *Enzimas são o principal alvo da pesquisa biotecnológica devido ao seu papel nos mecanismos celulares e a sua aplicação em processos industriais. A indústria de alimentos está entre as principais consumidoras de enzimas, pois essas são indispensáveis a processos tradicionais (cerveja) e inovadores (prebióticos). A microbiota do semi-árido baiano apresenta potencial para produção de enzimas de aplicação industrial. Este trabalho teve por objetivo selecionar fungos filamentosos, isolados do semi-árido baiano, secretores de hidrolases de interesse em alimentos, pela metodologia “cup plate”. Dos 20 fungos estudados, três apresentaram atividade sobre a celulose, dois apresentaram atividade sobre a pectina e 12 apresentaram atividade sobre proteínas.*

PALAVRAS-CHAVE: *Fungos; Semi-árido; Enzimas.*

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas com atividade catalítica, isto é, exercem a função de acelerar ou mesmo possibilitar reações

* Aluna do curso de Engenharia de Alimentos. DTEC (UEFS).
E-mail: toycloy@bol.com.br

** Prof. Adjunto. DTEC (UEFS). Doutora em Ciência da Alimentação (Unicamp). E-mail: mkoblitz@uefs.br

*** Prof. Adjunto. DCBIO (UEFS). Doutor em Botânica (UFRGS) DCBIO (UEFS). E-mail: agoesnt@uefs.br

**** Prof. Assistente. DCBIO (UEFS). Doutora em em Botânica (UFRGS). E-mail: apaula@uefs.br

Universidade Estadual de Feira de Santana – Dep. de Tecnologia. Tel./Fax (75) 3224-8056 - BR 116 – KM 03, Campus - Feira de Santana/BA – CEP 44031-460. E-mail: tec@uefs.br

entre componentes químicos. Presentes em todos os sistemas biológicos, são produzidas por todos os organismos vivos e têm a capacidade de atuar fora do meio celular. Constituem, atualmente, 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 (DO CANTO; MENEZES, 1995).

Atualmente, o maior empecilho ao uso de enzimas em processos industriais está relacionado ao alto custo desse catalisador (GANDHI, 1997). Apesar do alto custo da utilização de enzimas, suas vantagens em diversos campos são tão óbvias que uma variada gama de indústrias as utiliza em seus processos, movimentando um mercado de aproximadamente U\$ 1,5 bilhões (VAN BEILEN; LI, 2002). Os maiores consumidores deste mercado são as indústrias de: detergentes, alimentos e rações, papel e celulose, química fina e fármacos, seguidas de perto pela indústria têxtil e de manufatura de couros (PZSCZOLA, 2001).

Embora, tradicionalmente, as enzimas mais estudadas sejam de origem animal ou vegetal, as enzimas microbianas apresentam maior interesse, do ponto de vista da sua aplicação industrial, por serem mais facilmente produzidas em larga escala, via fermentação, por serem mais facilmente expressas (clonagem) em organismos de cultivo já estabelecido e pela enorme diversidade microbiana existente que oferece infinitas possibilidades de modos de ação, nas mais diversas condições (GANDHI, 1997). Um bom exemplo disso é a produção de enzimas termorresistentes por microrganismos extremófilos (HAKI; RAKSHIT, 2003).

O Brasil, atualmente, importa a maior parte das enzimas que utiliza, embora apresente um enorme potencial para produzi-las, por dois motivos em especial: abundância de matéria orgânica (resíduos agrícolas, como, palha de arroz, bagaço de cana, etc.) que constitui substrato de baixo custo para fermentações e a enorme diversidade biológica, ainda pouco explorada, para a descoberta de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial (DO CANTO; MENEZES, 1995).

A região do Semi-árido baiano é parte da diversidade biológica ainda pouco explorada no Brasil e possui caracterís-

ticas para apresentar organismos resistentes a condições extremas e, em consequência, enzimas de enorme potencial para aplicação em processos industriais. A Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) possui, atualmente, uma coleção de fungos filamentosos, isolados de diversas regiões e substratos do Semi-árido baiano, que pode ser fonte apreciável de enzimas com aplicabilidade industrial.

O presente trabalho teve como finalidade fazer uma triagem inicial, entre os microrganismos desta coleção, para seleção de fungos filamentosos secretores de enzimas de interesse para a indústria de alimentos. As enzimas dos organismos selecionados serão, futuramente, parcialmente purificadas e caracterizadas, quanto a diversas propriedades bioquímicas (temperatura e pH de atividade, substrato preferencial e modo de ação, etc.) de modo a se determinar suas mais prováveis aplicações em processos industriais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS

Foram testados 20 isolados de fungos filamentosos, ainda não identificados, obtidos da Coleção de Cultura do Departamento de Biologia da UEFS. Esses foram repicados para placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) e mantidos a 28°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), em incubadora tipo BOD, durante sete dias, para realização dos testes.

2.2 TESTES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os testes foram realizados segundo a metodologia descrita por Dingle, Reid e Salomons (1953). Inicialmente, os isolados foram transferidos para frascos erlenmeyer contendo 50mL dos meios de indução com a finalidade de estimular a secreção das enzimas em estudo. Cada isolado foi individualmente testado para secreção de proteases, pectinases, amilases e celulases. Os testes foram realizados em triplicata.

O meio base era composto de: 3,5g de fosfato de amônio; 0,75g de fosfato dibásico de potássio; 0,2g de cloreto de cálcio dihidratado; 1,25mL de solução traço de sais (0,1g de sulfato ferroso; 0,1g de cloreto manganoso; 0,1g de sulfato de zinco em 100mL de água destilada); 50mL de solução de glicose a 30%; 0,25g de sulfato de magnésio e 500mL de água destilada. A esse meio foram adicionados 2,5g dos substratos de indução a saber: amido (amilases), leite desnatado em pó + gelatina (proteases), carboximetilcelulose (celulases) e pectina cítrica (pectinases) e o pH ajustado para 7,0.

Dois *plugs* (pequenos discos de meio de cultura contendo micélio fúngico) de cada isolado foram inoculados nos meios de indução. Esses meios foram mantidos a 28°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), em incubadora tipo BOD, durante sete dias. Após esse período, os meios de cultura foram filtrados em papel filtro qualitativo, para separação do micélio, e o filtrado obtido foi utilizado nos testes de atividade enzimática.

Para o teste de atividade enzimática, 1,8g de ágar e 1g dos diferentes substratos de indução foram dissolvidos em 100mL de água destilada, esterilizados e distribuídos em placas de Petri, onde foram feitas perfurações circulares (técnica de “cup plate”), com diâmetro de 0,5cm, onde foram adicionados entre 50-100 μL dos filtrados. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24h e, em seguida, adicionadas de reveladores para visualização da formação de halos (indicativo de atividade enzimática). No caso das placas contendo leite e gelatina (atividade de protease), não foi necessária adição de revelador, uma vez que a hidrólise da caseína do leite pode ser percebida, pelo halo incolor, ao redor do ponto de aplicação do filtrado.

Os reveladores utilizados foram: vermelho congo (0,1g/100mL) – para detecção da atividade de celulases; HCl (5N) – para detecção da atividade de pectinases; iodo sublimado – para detecção da atividade de amilases.

A avaliação comparativa da atividade enzimática foi determinada pelo diâmetro do halo ao redor do ponto de aplicação do filtrado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 20 fungos testados, 14 (70%) apresentaram atividade para pelo menos um dos substratos testados. Dois deles apresentaram atividade sobre a pectina; três apresentaram atividade sobre a celulose e 12 apresentaram atividade sobre proteínas. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1- Atividade enzimática, pela técnica de “cup plate”, para os fungos testados.

Fungo ¹	Atividade sobre proteínas (Dm) ²	Atividade sobre pectina (Dm) ²	Atividade sobre celulose (Dm) ²
AO+AC.2.6	1,00	-	-
17	1,07	-	-
18	0,90	-	-
30	-	0,75	0,75
34	-	0,70	0,85
41	0,80	-	-
59	1,15	-	-
68	0,85	-	0,60
69	0,75	-	-
74	1,40	-	-
82	0,77	-	-
90	1,20	-	-
105	0,97	-	-
110	1,00	-	-

Os isolados 30 e 34 demonstraram atividade nos testes sobre pectina e celulose, e o fungo 34 foi o que apresentou maior atividade no teste sobre celulose. O isolado 68 apresentou atividade sobre os substratos celulose e proteínas. Os demais fungos demonstraram atividade para apenas um dos substratos testados, exceto sobre o amido, pois nenhum dos isolados testados apresentou resultado positivo para secreção de amilases.

As pectinases são usadas nas indústrias de sucos e vinhos como auxiliares de extração, filtração e clarificação, aumentando o rendimento, o aroma e a vida útil de filtros e “finishers” (PRETEL, 1997). As celulases encontram aplicação como auxiliares de pectinases nos processos mencionados. A secreção conjunta de pectinases e celulases (isolados 30 e 34) apresenta, portanto, vantagens para aplicação industrial. Além disso, celulases de alta eficiência *in vitro* são procuradas para possível obtenção de glicose a partir de resíduos agrícolas (GEHARTZ, 1997).

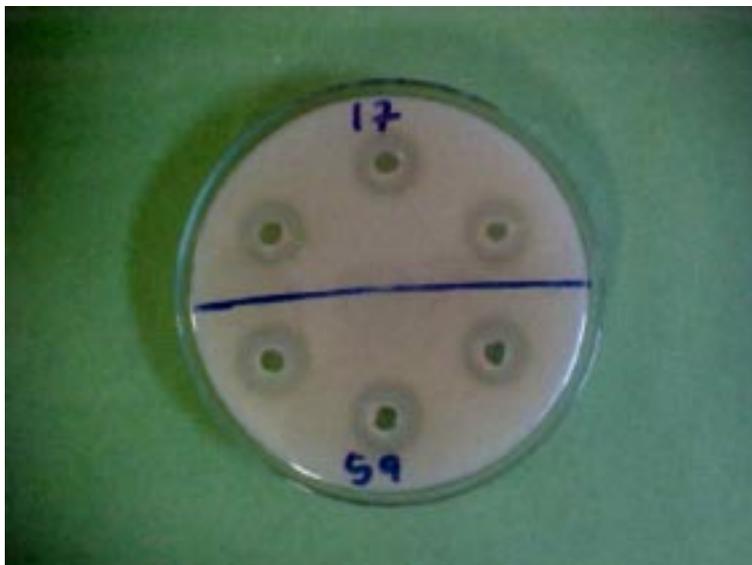


Figura 1- Resultados positivos obtidos para teste de protease em placa de leite e gelatina para os fungos 17 e 59.

No teste de produção de protease, foram obtidas as maiores atividades enzimáticas dos fungos testados (Tabela 1). Alguns isolados mostraram halo de degradação superiores a 1,00 cm (isolados AO+AC.2.6, 17, 59, 74, 90 e 110); a maior atividade foi observada no fungo 74 (1,40 cm). A Figura 1 mostra os halos de degradação de proteínas a partir dos isolados 17 e 59.

As proteases são aplicadas em inúmeros processos na indústria de alimentos. Da clarificação de cerveja e amaciamento de carne à síntese de aspartame e obtenção de flavorizantes e emulsificantes (hidrolisados protéicos) (WISEMANN, 1975).

4 CONCLUSÃO

70% dos fungos testados apresentaram atividade sobre, pelo menos, um dos substratos testados, confirmando o potencial dos fungos do Semi-árido baiano como secretores de enzimas de aplicabilidade industrial.

Dois dos isolados apresentaram atividade simultaneamente sobre pectina e celulose indicando potencial para aplicação nas indústrias de sucos e vinhos. Seis isolados apresentaram alta atividade sobre proteínas (halos com diâmetro superior a 1cm). A maior atividade proteolítica detectada foi apresentada pelo isolado n^o74. Nenhum dos fungos apresentou atividade enzimática sobre o substrato amido.

SELECTION OF HYDROLASIS SECRETING FUNGI OF INTEREST TO FOOD IN BAHIA SEMI-ARID REGION

ABSTRACT — *Enzymes are the main target of biotechnology research because of their role in cell mechanisms and also because of their application in industrial processes. The food industry is among the main enzyme consumers since these are involved in traditional processes (beer production) but also in new technologies (prebiotics). The microorganisms of the semi-arid region present potential for the production of enzymes for industrial application. This work had the purpose of selecting microorganisms, isolated from the semi-arid region in Bahia, which secrete hydrolasis of*

interest to the food industry, by the cup plate methodology. From the 20 tested fungi, three presented cellulase activity, two presented pectinase activity and 12 presented protease activity.

KEY WORDS: *Fungi; Semi-arid region; Enzymes.*

REFERÊNCIAS

DINGLE, J.; REID, W. W.; SOLOMONS, G.L. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. II. Application of the "cup-plate" assay to the estimation of enzymes. **Journal for the Science of Food and Agriculture**, n.4, p.149-155, 1953.

DO CANTO, W.L.; MENEZES, T. J. B. Estudos Econômicos – Alimentos Processados. **Produção, usos e mercado de enzimas**. Campinas: Ital. 1995.

GANDHI, N.N. Applications of Lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**. v..74, n. 6, p.621-634, 1997.

GEHARTZ, W. **Enzymes in industry: rroduction and application**. Weinheim: VCH, 1990.

HAKI, G.D; RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**: Article in Press. Disponível em: <www.elsevier.com/bioresourcetechology>, Acesso em: 2003.

PRETEL, M.T. Pectic enzymes in fresh fruit processing: optimization of enzymic peeling of oranges. **Process Biochemistry**. v. 32, n. 1, p. 43-49, 1997.

PZSCZOLA, D.E. From soybeans to spaghetti: the broadening use of enzymes. **Food Technology**, n. 55, p. 54-62, 2001.

VAN BEILEN, J.B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, n.13, p. 338-344, 2002.

WISEMAN, A. Industrial practice with enzymes: application and sources of industrial enzymes. In: **Handbook of Enzyme Biotechnology**. Chichester: Wiseman, A. Ellis Horwood, 1975. p.252-259.