

Bioprospecção de Enzimas Hidrolíticas Extracelulares em *Aureobasidium pullulans*

Gilberto de Aguiar Pereira¹; Guilherme Teixeira Gomes¹; Amanda Machado Rozolem¹; Elisete Pains Rodrigues¹; Fernando Gomes Barcellos¹

¹ Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral
Caixa Postal: 10.011 - CEP: 86057-970 - Londrina-PR. E-mail: gilbertopperera@gmail.com

RESUMO

O fungo "yeast like" Aureobasidium pullulans é notavelmente reconhecido por sua importância econômica graças ao seu potencial biotecnológico diverso, neste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar isolados deste fungo obtidos a partir da planta medicinal alecrim-do-campo (Baccharis dracunculifolia DC - Asteraceae) quanto a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares. Experimentos sobre a atividade enzimática de pectinases, proteases, celulases, esterases e lipases foram conduzidos. Com base nos resultados, no que diz respeito a capacidade de produção de enzimas: 69% dos isolados apresentaram atividade pectinolítica, 77% proteolítica e 100% deles possuíam atividade amilolítica, celulolítica e lipolítica. Este estudo revela que os microrganismos associados a plantas de B. dracunculifolia são grandes produtores de várias enzimas hidrolíticas e representam portanto, uma fonte promissora de enzimas para diferentes aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Planta Medicinal, Levedura, Enzimas

INTRODUÇÃO

Mais de 4000 enzimas são conhecidas e aproximadamente 200 são utilizadas comercialmente, sendo que a grande maioria possui origem microbiana (SHARM; CHISTI; BANERJEE, 2001). Dentre os micro-organismos produtores de enzimas destaca-se o fungo "yeast-like" *Aureobasidium pullulans*, que é notavelmente reconhecido por sua importância econômica graças ao seu potencial biotecnológico diverso, pois ele pode ser utilizado como produtor de diversas enzimas extracelulares tais como: proteases, lipases, amilases e xilanases, de "single-cell protein"; do polissacarídeo pululana e ainda de compostos sideróforos (CHI et al, 2009).

Enzimas de origem microbiana podem ser utilizadas como catalisadores em uma grande variedade de processos industriais; como no processamento de alimentos; na fabricação de ração animal, medicamentos e cosméticos; na indústria têxtil, de papel e de celulose; bem como na pesquisa e desenvolvimento biotecnológico. O Brasil apesar de possuir um enorme potencial para produção de enzimas, importa a maior parte das enzimas que utiliza (BARATTO et al, 2011); sendo assim, estudos que contribuam para a inserção e consolidação do Brasil como produtor de tecnologia enzimática se fazem necessários (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Diante deste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de enzimas

hidrolíticas de fungos identificados como *A. pullulans* associados a folhas e flores da planta medicinal alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC - Asteraceae).

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de folhas e flores saudáveis de *B. dracunculifolia* (Asteraceae) coletadas na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (UEL) foram processadas logo após a coleta no Laboratório de Genética de Micro-Organismos da UEL (LAGEM-UEL) onde foram lavadas em água corrente e desinfestadas com cloramina-T 1%. Em seguida, 1 g de flores ou folhas foram maceradas em 9 mL de salina e diluídas de forma seriada (1:10). Aliquotas de 0.1 mL das diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram então inoculadas na superfície dos meios sólidos "Potato Dextrose Agar" (PDA) contendo ampicilina e "Tryptone Soya Agar" (TSA) contendo ciclohexamida. Após o crescimento por 7 dias a 28°C, colônias morfologicamente distintas, foram repicadas para placas novas contendo PDA e TSA sem antibiótico, até que os isolados fossem purificados; as culturas puras foram então armazenadas em "Potato Dextrose Broth" (BDB) ou "Tryptone Soya Broth" (TSB) + glicerol 50% a 4°C. Complementarmente, isolados selecionados foram identificados através de técnicas moleculares baseadas na análise da sequência ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA.

Os isolados identificados como *A. pullulans*, foram avaliados com relação a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas de acordo com a metodologia descrita por Strauss et al., 2001; Buzzini e Martini, 2002. Para avaliação da atividade das enzimas protease e celulase foram utilizados os meios de cultura, respectivamente, "Yeast Extract-Peptone-Glucose" (YEPG) com 2% caseína e YEPG com 0.5% de carboximetilcelulose (Strauss et al., 2001; Buzzini & Martini, 2002). Os ensaios de atividade das enzimas pectinase, amilase, lipase e esterase, foram realizados, respectivamente, nos meios sólidos "Yeast Nitrogen Base" (YNB) com 1% pectina, YNB com 0.2% de amido, Ágar-óleo com 1% óleo e Ágar-Tween com 1% de Tween 80 (Buzzini & Martini, 2002). Os ensaios foram realizados em triplicata e após crescimento por 3-5 dias a 28°C as atividades enzimáticas dos isolados foram avaliadas qualitativamente pela produção de halo de degradação ao redor da colônia, a qual é o indicativo visual da hidrólise dos respectivos substratos. O índice de atividade enzimática (IE) foi estimado pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (ANAGNOSTAKIS; HANKIN, 1975) e expressos como IE \pm desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises das sequências ITS1-5,8S-ITS2 rDNA revelaram que a coleção de micro-organismos isolados de *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae) do LAGEM-UEL é composta por 13 isolados identificados como *A. pullulans* (dados não apresentados). Com relação a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas: 69% dos isolados apresentaram atividade pectinolítica, 77% atividade proteolítica e 100% deles possuíam atividade amilolítica, celulolítica e lipolítica, assim como pode ser observado na tabela 1.

Os maiores halos de degradação, constatados através da análise dos experimentos realizados, apontaram que os substratos utilizados para a avaliação da enzima lipase eram os que sofriam maior hidrólise, apresentando índices enzimáticos de até 6,9 (tabela 2). Resultados bem diferentes dos encontrados por Kudanga et al. 2007 e Buzzini e Martini. 2002 em *A. pullulans* isolados de água, solo, insetos e plantas; e mais semelhantes aos encontrados por

Brandão et al. 2011 em um lago onde 95% dos isolados de *A. pullulans* apresentavam atividade lipolítica. Com isso é possível observar que a planta medicinal *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae) é um habitat promissor para leveduras produtoras de uma grande variedade de enzimas hidrolíticas extracelulares, principalmente lipases.

TABELA 1: Perfil de atividade enzimática de *A. pullulans* isolados da planta medicinal *B. dracunculifolia*

	Protease	Celulase	Pectinase	Lipase	Amilase
Bd 08	+	+	+	+	+
Bd 14	+	+	+	+	+
Bd 15	+	+	+	+	+
Bd 16	-	+	+	+	+
Bd 20	+	+	+	+	+
Bd 24	+	+	+	+	+
Bd 26	+	+	+	+	+
Bd 33	-	+	+	+	+
Bd 34	+	+	-	+	+
Bd 36	+	+	-	+	+
Bd 37	+	+	-	+	+
Bd 39	+	+	-	+	+
Bd 65	-	+	+	+	+

+ atividade enzimática presente; - atividade enzimática ausente

Tabela 2: Índice enzimático (IE)¹ da enzima lipase obtidos a partir *A. pullulans* isolados da planta medicinal *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae)

	IE
Bd 08	6.2 (±1.8)
Bd 14	5.6 (±0.7)
Bd 15	6.5 (±2.2)
Bd 16	4.0 (±1.6)
Bd 20	6.0 (±0.4)
Bd 24	5.8 (±0.5)
Bd 26	6.9 (±1.0)
Bd 33	4.4 (±1.2)
Bd 34	5.5 (±0.7)
Bd 36	5.6 (±0.7)
Bd 37	5.5 (±0.9)
Bd 39	6.3 (±0.3)
Bd 65	4.6 (±0.4)

IE: diâmetro do halo/diâmetro da colônia. Médias de três repetições ± desvio padrão

CONCLUSÃO

A bioprospecção enzimática inicial constitui-se em uma etapa primária para a caracterização do potencial enzimático dos isolados avaliados. Sendo assim, os isolados que foram identificados como promissores para a produção das diversas enzimas testadas, especialmente as lipolíticas, serão posteriormente avaliados com relação ao aperfeiçoamento das condições de cultivo para otimizar o processo de produção e ainda contribuir com o possível desenvolvimento e produção de novas enzimas hidrolíticas, as quais poderão vir a se tornar novas alternativas às enzimas hidrolíticas atualmente comercializadas e utilizadas em diferentes processos biotecnológicos e industriais.

Agências de fomento: Capes, CNPq e Fundação Araucária

REFERÊNCIAS

- BARATTO, C. M. et al. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência-Ciência e Biotecnologia**, v. 11, n. 2, p. 15-28, 2012.
- BRANDÃO, L. R. et al. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n.1, p. 1-13, 2011.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**. V. 93, n.6. p. 1020-1025, 2002.
- CHI, Z. et al. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 82, n. 5, p. 793-804, 2009.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**. v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.
- KUDANGA, T. et al. Esterases and putative lipases from tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 138-147, 2007.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v.3; n.5; p. 9-23, 2009.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.
- STRAUSS, M. et al. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**. v.91, n.1, p. 182-190, 2001.