

# DOSAGEM DE PROTEÍNA EM FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.

B. F. IZIDORO<sup>1</sup>, O. DOMINGUES<sup>1</sup>, F. P. PICHELI<sup>1</sup>, E. A. L. GATTÁS<sup>2</sup> e A. V. DE PAULA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista, Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista, Departamento de Alimentos e Nutrição

E-mail para contato: barbara\_izidoro@hotmail.com, ariela@fcfar.unesp.br

**RESUMO** – O objetivo principal da presente pesquisa foi avaliar o desempenho da produção de enzimas pectinolíticas por diferentes fungos filamentosos, e quantificar o teor de proteínas empregando-se diferentes metodologias. Para isto, os fungos passaram por registros fotográficos em meios contendo pectina cítrica e corante, no qual halos de crescimento e consumo de pectina foram medidos e fotografados. Além disso, fizeram-se quantificações de proteínas, pelos métodos de Bradford e Lowry, para (pectinases) produzidas por esses fungos, em meio líquido. O fungo que apresentou maior teor de proteínas ( $0,140 \pm 0,002$  por Bradford e  $3,726 \pm 0,010$  por Lowry) foi o KW4.

## 1. INTRODUÇÃO

As pectinases, são um grupo diversificado de enzimas, que podem ser encontradas em plantas e microrganismos e tem a capacidade de hidrolisar pectina, um polissacarídeo constituído principalmente por galacturonoglicanos e *ramnogalacturonanas* (Sing *et al.*, 1999), presente na parede celular e na lamela média das plantas (Alkorta *et al.*, 1998) e que pode ser utilizado como agente emulsionante, gelificante, e como estabilizador na indústria alimentar (Rao & Silva, 2006).

A atuação dessas enzimas na natureza é de extrema importância, uma vez que estas promovem a degradação e a reciclagem de restos orgânicos no meio e podem mediar reações bioquímicas de patogênese ou deterioração, como o apodrecimento de frutas e vegetais (Schink, & Zeikus, 1983).

Diversos organismos são capazes de produzir essas enzimas, bem como bactérias, plantas, fungos filamentosos e também algumas leveduras (Alkorta *et al.*, 1998). As pectinases microbianas constituem cerca de 25% do comércio de enzimas alimentares no mundo (Sing *et al.*, 1999), destacando-se como principal fonte, os fungos filamentosos, que foram utilizados por mais de 50 anos nas indústrias de alimentos (Dalbøge, 1997).

Na presente pesquisa, os fungos foram analisados, identificados e testados, afim de estipular os melhores produtores da enzima pectinolítica.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Análise e registro fotográfico

Os fungos foram inoculados em placas de petri, 90 mm, com meio de pectina cítrica 1% (m/v), fosfato diácido de potássio 0,1% (m/v), peptona 0,5% (m/v), agar-agar 1,8% (m/v) e sulfato de magnésio 0,05% (m/v). Na inoculação, umas quantidades mínimas de esporos dos fungos foram passados para o centro da placa, utilizando uma agulha bacteriológica. Após 24 e 48 horas em DBO, ocorreram as medidas dos halos de crescimento e do consumo de pectina nas placas, com auxílio de régua. Por fim, adicionou-se de corante vermelho de rutênio 0,5% m/v nas placas e fez-se o registro fotográfico destas dos mesmos. É importante ressaltar que todos os materiais e meios utilizados foram previamente esterilizados em autoclave (15 minutos, 121°C) e a inoculação ocorreu em fluxo laminar.

## **2.2 Curva de calibração**

Para a curva de calibração, foram realizados testes com soro albumina bovina (SBA), preparando-se uma solução com concentração 20 µg/mL de SBA. Os dados obtidos foram organizados e esquematizados para servir como base nas dosagens de proteínas dos fungos.

## **2.3 Repique e crescimento do fungo em meio de cultivo líquido**

Os fungos foram reativados durante 7 dias, à 30°C, dentro de tubos de ensaio inclinados contendo PDA (39g/L). Depois, foram passados dos tubos para as placas de petri, 90 mm, contendo a mesma quantidade de PDA. Após uma semana crescendo em DBO, os fungos foram inoculados em meio líquido. Foram retirados 8 discos de micela de cada placa, com tubos de ensaio (8 mm), e inoculados em Erlenmeyers de 250 ml contendo o meio líquido, composto por 0,5 g de fosfato diácido de potássio, 0,5 g de sulfato de magnésio, 0,5 g de triptona, 2,5 g de pectina cítrica e 0,5 g de cloreto de cálcio em 50 ml de água destilada. Para crescer, os inóculos voltaram ao DBO por mais 7 dias.

## **2.4 Filtração e dosagem de proteínas**

Após o crescimento, os inóculos contendo os fungos passaram por processos de filtração à vácuo. A fase líquida (filtrado) obtida foi utilizada para a dosagem de proteína. O procedimento foi realizado por dois métodos: Bradford e Lowry. Para o primeiro método, 0,8 ml dos filtrados diluídos (proporção 1:10) foram misturados com 0,8 ml do reagente de Bradford industrial em tubos de ensaio, aguardando-se 5 minutos para a reação, que deve ocorrer na ausência de luz, a leitura da solução no espectrofotômetro ocorreu em cubetas de plástico em 595 nm. No segundo método, misturou-se 1 ml dos filtrados diluídos (proporção 1:10) com 5 ml da solução cupro-alkalina, que deve ser preparado da seguinte maneira: primeiramente, para a solução A, deve-se misturar carbonato de sódio 2% (m/v) e hidróxido de sódio (0,1 mol/L), o qual deve ser pesado utilizando materiais de plástico, em um balão volumétrico e completar com água destilada, acertando o menisco com uma pipeta; para a solução B, sulfato de cobre 1% (m/v), e solução C, Tart-Na/K 1% (m/v), deve-se pesar as quantidades desejadas dos dois reagentes, colocá-los em balões volumétricos e acertar os meniscos; por fim, deve-se misturar em um béquer 50 ml de solução A com 0,5 ml de cada uma das demais soluções. As soluções contendo o filtrado e a solução cupro-alkalina foram então homogeneizadas no agitador vórtex e deixadas para reagir por 15 minutos. Decorrido o tempo, foram adicionados em cada um dos tubos, 0,5 ml de *Folin-Calteu*, utilizando luvas descartáveis. As soluções foram novamente homogeneizadas e depois feita a leitura em



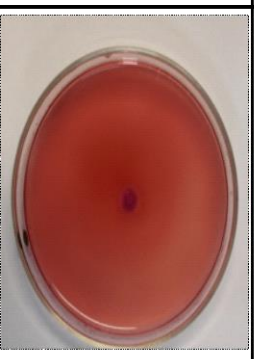
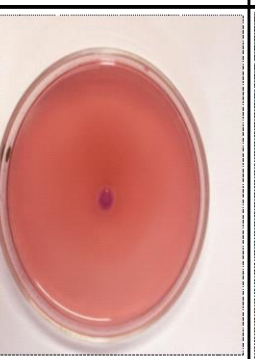






espectrofotômetro em 660 nm. Ressalta-se que para ambos os métodos, o branco utilizado, foi feito substituindo o filtrado pela mesma quantidade de água.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Registro fotográfico

Nos períodos de 24h e 48h houve o registro fotográfico dos halos de crescimento e degradação de pectina devido à ação de diferentes fungos produtores de enzima, representados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Registro fotográfico dos halos de crescimento de diferentes fungos: KW4, CFCF, HC1, L1, KW9

KW4	CFCF	HC1	L1	KW9
24h	24h	24h	24h	24h
				
48h	48h	48h	48h	48h
				

A medição das colônias e do halo de degradação da pectina, Tabela 2, foi realizada após os períodos de 24h e 48h, utilizando corante vermelho de rutênio.

**Tabela 2** – Colônia e halo de degradação da pectina

Fungo	Colônia 24h (cm)*	Colônia 48h (cm)*	Halo 24h (cm)*	Halo 48h (cm)*
L1	0,8 ± 0,05	2 ± 0,05	1 ± 0,05	2,4 ± 0,05
KW4	0,6 ± 0,05	1,8 ± 0,05	1 ± 0,05	2,5 ± 0,05
CFCF	1 ± 0,05	2 ± 0,05	1,4 ± 0,05	2,5 ± 0,05
HC1	0,8 ± 0,05	2 ± 0,05	1 ± 0,05	2,5 ± 0,05
KW9	0,5 ± 0,05	1,8 ± 0,05	0,8 ± 0,05	2,3 ± 0,05

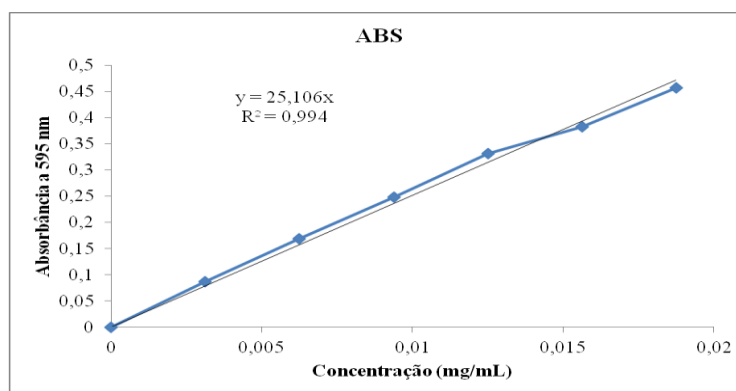
\*medida ± incerteza da régua

Verificou-se que o melhor produtor da enzima pectinolítica, de acordo com a diferença entre o crescimento dos halos de degradação e os halos de crescimento das colônias, foi o fungo KW4. Pode-se classificar os fungos quanto à produção de enzima na seguinte ordem: KW4, CFCF, KW9, HC1 e L1.

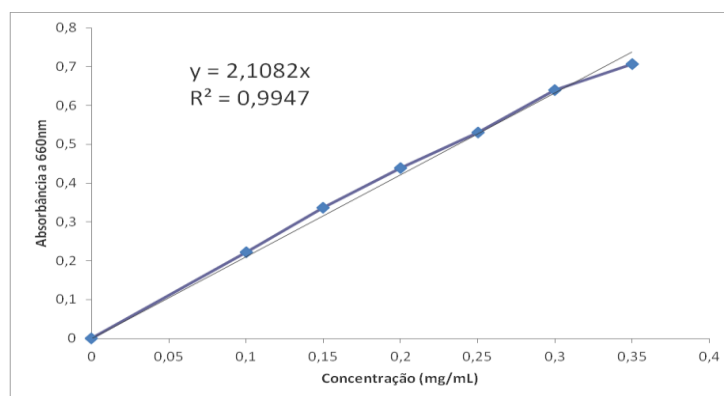
### 3.2. Curva de calibração

Foram construídas curvas de calibração para quantificação de proteínas a partir de dois métodos: Bradford e Lowry e as curvas são apresentadas nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

**Figura 1** – Curva de calibração por Bradford



**Figura 2** – Curva de calibração por Lowry



Os resultados permitiram relacionar a absorbância com a concentração de proteínas, e desta forma, quantificar o teor de proteínas dos meios de produção. Os resultados são apresentados a seguir.

### 3.4 Dosagem de proteína

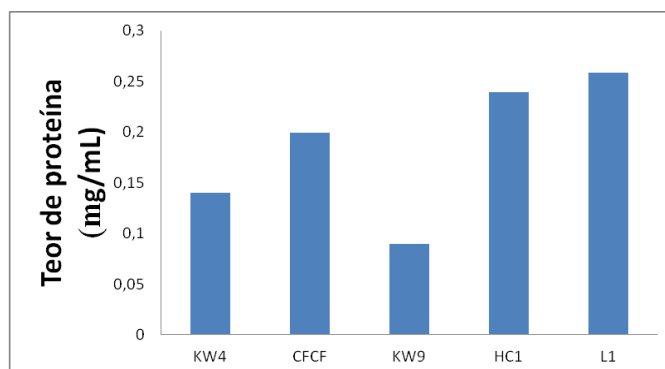
Os dados de dosagem de proteína por Bradford e Lowry dos 5 fungos avaliados no presente trabalho estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** – Quantificação do teor de proteína por Bradford e Lowry

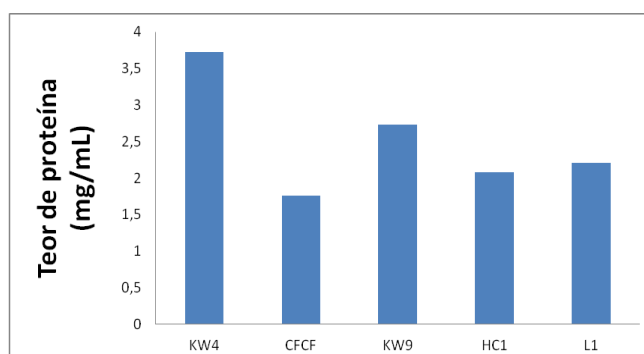
Fungo	Proteína Bradford (mg/ml)	Proteína Lowry (mg/ml)
<b>KW4</b>	0,140 ± 0,002	3,726 ± 0,010
<b>CFCF</b>	0,199 ± 0,007	1,765 ± 0,235
<b>KW9</b>	0,090 ± 0,003	2,732 ± 0,007
<b>HC1</b>	0,234 ± 0,000	2,075 ± 0,010
<b>L1</b>	0,258 ± 0,006	2,210 ± 0,000

As figuras 3 e 4 apresentam os teores de proteína produzidos devido à ação dos diferentes fungos avaliados.

**Figura 3** – Teor de proteínas dos diferentes fungos empregando-se Bradford



**Figura 4** – Teor de proteínas dos diferentes fungos empregando-se Lowry





Foram observadas diferenças no teor de proteínas empregando-se diferentes metodologias de quantificação. Nas dosagens por Bradford, destaca-se o fungo L1 ( $0,258 \pm 0,006$  mg/mL), enquanto nas dosagens por Lowry o melhor produtor de enzimas foi o KW4 ( $3,726 \pm 0,010$  mg/mL).

#### 4. CONCLUSÃO

Tanto nas análises dos halos de crescimento e consumo quanto nas análises de quantificação de proteínas por Lowry, o maior desempenho foi do fungo KW4. Não houve correspondência entre os diferentes métodos de dosagem de proteínas realizados na pesquisa. De maneira geral, destacam-se os fungos L1 e KW4 como bons produtores de enzimas pectinolíticas.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; & SERRA, J. L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 33(1), 21–28.
- DALBØGE, H. (1997) *Expression cloning of fungal enzyme genes: a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance*. FEMS Microbiol. Rev. 21, 29–42. MOHNE, D. *Pectin structure and biosynthesis*, Curr. Opin. Plant. Biol. 11 (2008) 266-277.
- RAO, M., & SILVA, J. L. d. (2006). Pectins: Structure, functionality, and uses. In: *Food Polysaccharides and Their Applications*, pp. 353–411. Stephen, A. M., Phillips, G. O. and Williams, P. A., Eds., Boca Raton, Florida: CRC Press.
- SCHINK, B.; & ZEIKUS, J.G. *Characterization of pectinolytic enzymes of Clostridium thermosulfurogenes*. FEMS Microbiology Letters 17 (1983) 295-298.
- SINGH, S.A.; RAMAKRISHNA, M.; & RAO, A.G.A. Optimization of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented broth of *Aspergillus carbonarius*. *Process Biochem* 1999; 35:411–7.