

# **DOSAGEM DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS**

O. DOMINGUES<sup>1</sup>, B. F. IZIDORO<sup>1</sup>, F. P. PICHELI<sup>1</sup>, A. V. DE PAULA<sup>1</sup> e E. A. L. GATTÁS<sup>2</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: otavio\_domingues2013@hotmail.com

**RESUMO** – O presente trabalho teve como objetivo a análise e caracterização de fungos coletados no Campus Universitário da UNESP de Araraquara através do cultivo em meio sólido e líquido, quanto a produção de enzimas pectinolíticas. Primeiramente, os fungos foram inoculados em meio sólido, contendo pectina cítrica, para o desenvolvimento e posterior análise do halo de crescimento e degradação da pectina do meio. Posteriormente, os fungos foram inoculados em meio líquido, avaliando-se três diferentes fontes de nitrogênio: extrato de levedura, peptona e triptona. Após o período de 7 dias de crescimento em estufa bacteriológica os meios foram filtrados à vácuo e realizada a dosagem da atividade enzimática, pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para determinação de açúcares redutores. Os melhores resultados foram obtidos com o uso da triptona como fonte de nitrogênio. Foram quantificados os valores de atividade pectinolítica e os fungos foram classificados quanto à produção da enzima desejada. Após os resultados obtidos, conclui-se que não há obrigatoriedade de semelhança entre o melhor fungo em crescimento e o produtor da enzima desejada, sendo destaque o fungo CFCF.

## **1. INTRODUÇÃO**

Enzimas pectinolíticas, ou pectinases, são um grupo diversificado de enzimas presentes em fungos filamentosos, leveduras e bactérias que possuem a capacidade de degradação de substâncias pectínicas comuns a biomassa vegetal (Uenojo, Pastore, 2007). Possuem a capacidade de hidrolisar pectina, um polissacarídeo 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 indústria de alimentos é de extrema importância na produção de bebidas por reduzir o amargor característico de citrus, diminuir viscosidade e a turbidez de sucos concentrados, na transformação de frutas e legumes, na produção de vinho, na extração de azeite e em inúmeros outros processos (Dalbøge, 1997). Esta demanda funcional em nível industrial torna crescente a busca por métodos viáveis e eficazes para obtenção destas e seus produtores. 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). A capacidade de produção destas enzimas microbianas está ligada à disponibilidade de fontes de nitrogênio e carbono além das condições de cultivo dos mesmos (Uenojo, Pastore, 2007).

No presente trabalho, 4 fungos (KW4, CFCE, HC1, L1) foram analisados, identificados e testados a fim de estipular o melhor produtor da enzima e o meio ideal para seu desenvolvimento.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Caracterização e registro fotográfico**

Os fungos foram repicados em placas de Petri, 90 mm x 15 mm, contendo meio de pectina cítrica 1% (m/v), peptona 0,5% (m/v), fosfato diácido de potássio 0,1% (m/v), sulfato de magnésio 0,05% (m/v) e ágar 1,8% (m/v), previamente esterilizados em autoclave (15 minutos, 121°C, 1 atm.). Para inoculação foi utilizado uma agulha bacteriológica, na qual apenas uma quantidade mínima de esporos dos fungos deve ser passada para o centro da placa. Após o período de incubação por 24h e 48h em estufa bacteriológica a 30 °C, foram feitas medidas utilizando régua milimetrada dos halos de crescimento dos fungos e de consumo de pectina nas placas. Posteriormente as placas foram fotografadas. O halo foi revelado com o corante vermelho de rutênio 0,5% (m/v).

### **2.2. Repique e crescimento do fungo em meio de cultivo líquido e filtração**

Inicialmente cada um dos 4 fungos foram repicados em placas de Petri, 90 mm x 15 mm, contendo meio batata – destrose – ágar (BDA) (39 g/L). Após 7 dias em estufa bacteriológica os fungos crescidos nas placas foram inoculados em meio BDA líquido. Utilizando tubos de ensaio (8 mm de diâmetro), 8 discos de micélio foram retirados de cada placa e inoculados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo líquido com a seguinte composição: 10 g/L de sulfato de magnésio, 10 g/L fosfato diácido de potássio, 10 g/L de cloreto de cálcio, 10 g/L de triptona e 50 g/L de pectina cítrica. O cultivo foi mantido em estufa bacteriológica por 7 dias a 30 °C. Após o crescimento, os meios fermentados foram filtrados à vácuo para recuperação da biomassa e do caldo contendo enzimas. A fase líquida obtida de cada filtração foi utilizada para a dosagem da atividade enzimática.

### **2.3. Curva de calibração - açúcares redutores**

Para quantificação dos açúcares formados durante a ação das enzimas contidas nos caldos fermentados sobre substrato de pectina, foi feita uma curva de calibração com o padrão de ácido galacturônico (5 mg/mL) submetido a reação de determinação de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). A solução padrão estoque foi diluída conforme demanda e a reação se deu adicionando 0,5 mL do padrão diluído a 0,5 mL do reativo contendo DNS em tubo de ensaio submetido a fervura por 5 minutos. Em seguida resfriado e acrescido de 5 mL de água destilada para posterior leitura em 540 nm em espectrofotômetro UV-Visível. Medidas foram realizadas em triplicata.

## 2.4. Dosagem da atividade enzimática

Para a dosagem de atividade enzimática, o método a ser utilizado foi o de Miller (1959). Preparou-se uma solução de pectina cítrica 1% (m/v) em tampão de acetato de sódio (50 mM, pH 5,5). Em tubos de ensaio, foram adicionados 2 mL da solução de pectina e 0,5 mL do filtrado diluído, proporção: 1:10. Os tubos foram deixados em banho-maria (37°C) por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a reação com o reativo de DNS conforme descrito para a curva de calibração. O branco analítico se deu pela substituição de caldo fermentado filtrado por solução tampão acetato de sódio.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1. Caracterização e registro fotográfico

Após a incubação das placas inoculadas de esporos, foi realizada a medição das colônias e dos halos de degradação da pectina e o registro fotográfico dos mesmos. Dados contidos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

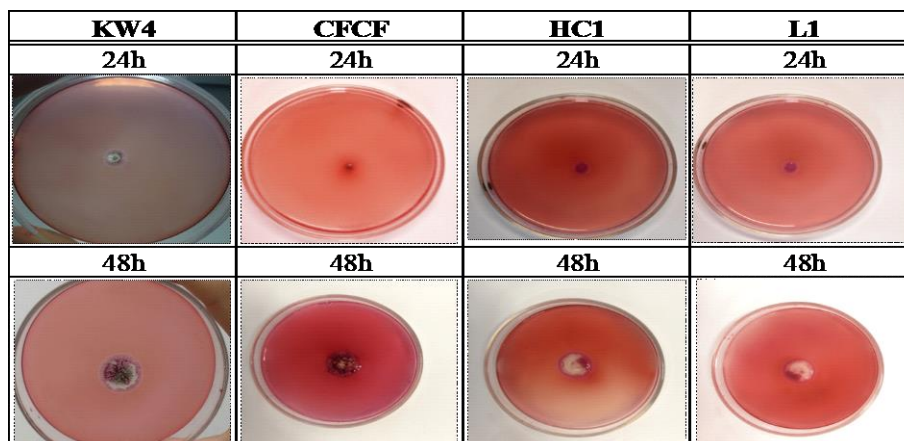
**Tabela 1** – Colônia e halo de degradação

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 ± desvio padrão

De acordo com a Tabela 1, foi possível concluir que o fungo KW4 mostra-se com melhor crescimento tanto de colônia (1,2 cm) quanto do halo de degradação (1,5 cm), obtendo uma maior diferença entre os tamanhos da colônia e dos halos nos períodos de 24h e 48h, se comparado aos demais fungos.

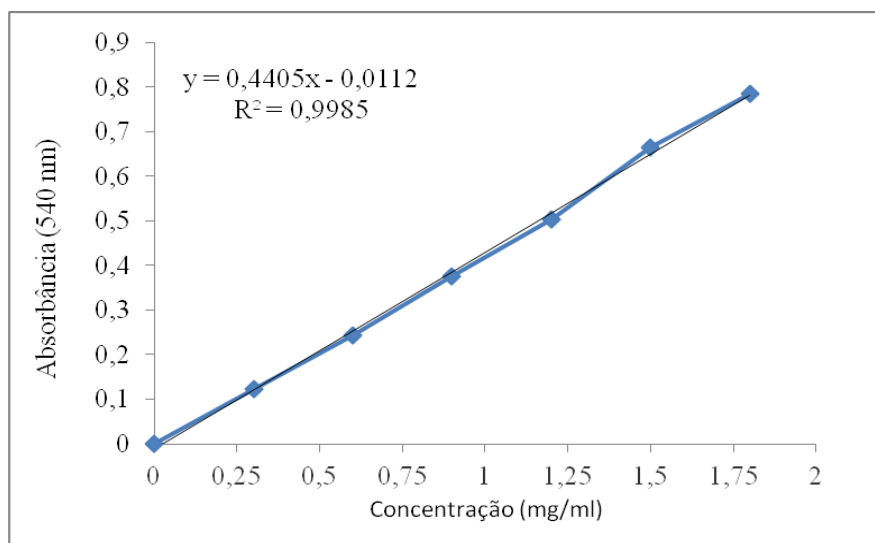
**Tabela 2** – Colônia e halo de degradação (Fotos)



### 3.2. Curva de calibração

Inicialmente, construiu-se uma curva de calibração do ácido galacturônico, apresentada na Figura 1.

**Figura 1** – Curva de calibração do ácido galacturônico



Observa-se uma boa relação entre a concentração de ácido galacturônico e absorbância, sendo possível a partir dos dados obtidos calcular a atividade enzimática de cada filtrado.

### 3.3. Dosagem de atividade

Após o cultivo em meio sólido, os fungos foram inoculados em meio líquido para a dosagem da atividade enzimática. Os dados da atividade dos 4 fungos estão na Tabela 4.

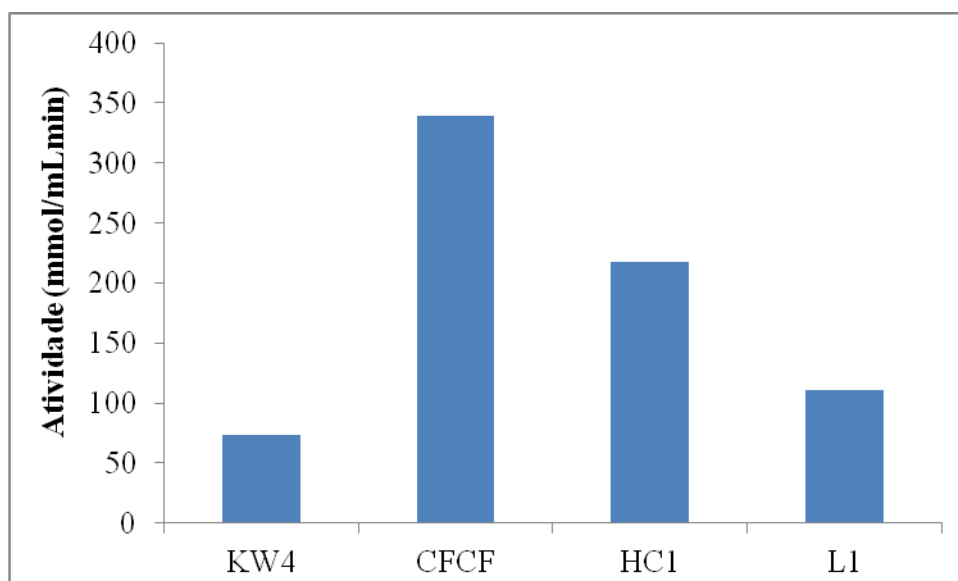
**Tabela 4** – Atividade enzimática dos diferentes fungos

Fungo	Atividade (mmol/mLmin)
KW4	73,245 ± 0,258
CFCF	339,376 ± 81,111
HC1	217,361 ± 19,632
L1	110,872 ± 83,436

\*medida ± desvio padrão

A fim de facilitar a comparação dos resultados obtidos, a partir dos dados da tabela 4, construiu-se a Figura 2, que relaciona a atividade enzimática e o fungo avaliado.

**Figura 2** – Quantificação da atividade enzimática



De acordo com os resultados obtidos, o fungo que forneceu enzima com maior atividade foi o CFCF, seguido dos fungos HC1, L1 e KW4. Dentre os fungos capazes de produzir enzimas pectinolíticas no meio de cultivo, o fungo *Aspergillus sp.* CFCF-0492 apresentou a maior atividade enzimática (15,0 mmol/mLmin) quanto aos demais fungos em crescimento isolado (Gattás *et al.*, 2003). Entretanto, a atividade enzimática do CFCF mostrou-se superior à obtida na utilização de *Aspergillus niger* na fermentação submersa em meio Czapeck enriquecido com uso de casca de laranja como fonte de carbono, apresentando uma atividade de  $117.1 \pm 3,4$  mmol/mLmin (Ahmed *et al.*, 2016.). Dessa forma, os resultados obtidos nas dosagens das atividades são positivos quando comparados com as atividades apresentadas pelos trabalhos utilizados como base para o projeto.

#### 4. CONCLUSÃO

Com base nas análises do registro fotográfico destaca-se o fungo KW4 com o maior crescimento mensurado. O CFCF mostra-se como o segundo melhor no crescimento da colônia e dos halos, sendo o que forneceu maior atividade enzimática. Não houve relação direta entre o melhor fungo em termos de crescimento e aquele que fornece maior atividade enzimática. Portanto, dentre os fungos avaliados no presente estudo, o CFCF foi o melhor fungo, devendo ser explorado em estudos futuros.

#### 5. REFERÊNCIAS

- AHMED, I.; ZIA, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AKRAM, Z.; NAVEED, M. T.; NOWROUZI, A. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, v 9, p. 148 – 154, 2016.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. Process Biochemistry, v. 33, n. 1, p. 21 – 28, 1998.

- DALBØGE, H. Expression cloning of fungal enzyme genes: a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. *FEMS Microbiology*, n. 12, p. 29 – 42, 1997.
- GATTÁS, E. A. L.; CANGUÇU, U. M.; RAMOS, W. S.. Isolamento de fungos produtores de enzimas pectinolíticas. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v. 24, n. 1, p. 33 – 37, 2003.
- MOHNE, D. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 11, p. 266 – 277, 2008.
- RAO, M., SILVA, J. L. Pectins: Structure, functionality, and uses. In: *Food Polysaccharides and Their Applications*. Eds. STEPHEN, A. M., PHILLIPS, G. O., WILLIAMS, P. A. Ed. Boca Raton. CRC Press. Florida, p. 353 – 411, 2006.
- 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.
- UENOJO, M.; PASTORE, G. A. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 388 – 394, 2007.